

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

А. УАЙТ, Ф. ХЕНДЛЕР, Э. СМИТ,
Р. ХИЛЛ, И. ЛЕМАН

[2]



Principles of biochemistry

sixth edition

ABRAHAM WHITE, PH. D.

Distinguished Scientist, Syntex Research
Consulting Professor of Biochemistry
Stanford University School of Medicine

PHILIP HANDLER, PH. D.

President, National Academy of Sciences
James B. Duke Professor of Biochemistry
Duke University School of Medicine

EMIL L. SMITH, PH. D.

Professor and Chairman, Department of Biological Chemistry
School of Medicine
University of California, Los Angeles

ROBERT L. HILL, PH. D.

James B. Duke Professor and Chairman,
Department of Biochemistry
Duke University School of Medicine

I. ROBERT LEHMAN, PH. D.

Professor and Chairman, Department of Biochemistry
Stanford University School of Medicine

MCGRAW-HILL BOOK COMPANY

New York
Auckland
London
New Delhi
Singapore
St. Louis

Bogotá
Madrid
Panama
Sydney
San Francisco
Düsseldorf

Mexico
Paris
Tokyo
Johannesburg
Montreal
São Paulo
Toronto

А. УАЙТ, Ф. ХЕНДЛЕР,
Э. СМИТ, Р. ХИЛЛ,
И. ЛЕМАН

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

В трех томах

[2]

Перевод с английского
чл.-корр. АН СССР В. П. Скулачева,
доктора хим. наук Э. И. Будовского,
доктора хим. наук Л. М. Гинодмана

под редакцией
академика Ю. А. Овчинникова

ИЗДАТЕЛЬСТВО <МИР>

МОСКВА

1981

ББК 28.072

О-75

УДК 571.1

Авторы: А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман
О-75 Основы биохимии: в 3-х томах. Т. 2. Пер. с англ./Перевод
В. П. Скулачева, Э. И. Будовского, Л. М. Гиномдана; Под
ред. Ю. А. Овчинникова. — М.: Мир, 1981. — 617 с., ил.

В книге американских авторов изложены основные представления современной биохимии; она позволяет также получить необходимые представления о смежных разделах биологической науки, в которых успешно используются подходы и методы биохимии.

В том 2 вошли гл. 14—28, в которых рассмотрен метаболизм углеводов, липидов и аминокислот, а также генетика метаболизма; изложены краткие сведения о вирусах.

Предназначена для преподавателей и студентов, для научных работников, специализирующихся в этой области.

О $\frac{20505-196}{041(01)-81}$ 85-81, ч. 1 2015000000

ББК 28.072

57.04

Редакция литературы по химии

© 1978, 1973, 1968, 1964, 1959 by McGraw-Hill, Inc. All rights reserved

© 1954 by McGraw-Hill, Inc. All rights reserved

© Перевод на русский язык, «Мир», 1981

А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

Том 2

Научный редактор Т. Т. Орловская. Мл. научный редактор Н. Н. Устякова.

Художник С. И. Мухин. Художественный редактор М. Н. Кузьмина.

Технический редактор Е. С. Потапенкова. Корректор Т. П. Пашковская.

ИБ 2673

Сдано в набор 18.02.81. Подписано к печати 22.07.81. Формат 60×90¹/₁₆.

Бумага типографская № 1. Гарнитура латинская. Печать высокая. Объем 19,25 бум. л.

Усл. печ. л. 38,5. Усл. кр. отт. 38,96. Уч.-изд. л. 41,71. Изд. № 3/0813. Тираж 13 000 экз.

Зак. 1358. Цена 3 р. 80 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР». Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. Москва, 113105, Нагатинская ул., д. 1.

ЧАСТЬ ТРЕТЬЯ

МЕТАБОЛИЗМ

(продолжение)

Глава 14

МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ. I

*Переваривание. Всасывание.
Гликолиз. Анаплероз. Глюконеогенез.
Фосфоглюконатный окислительный путь*

Детальное изучение метаболизма, естественно, должно начинаться с рассмотрения метаболизма углеводов. На синтез углеводов и генерацию АТР направлен процесс поглощения солнечной электромагнитной энергии содержащими хлорофилл клетками — первичный источник энергии для всех биологических процессов (гл. 13). В ходе дальнейшего метаболизма этих углеводов в растениях и микроорганизмах образуются аминокислоты, пурины, пиримидины, жирные кислоты, витамины и др., которые накапливаются в процессе роста; впоследствии они могут служить питательными веществами для животного мира. Получая небольшие количества аминокислот, липидов, витаминов и минеральных веществ, требующихся в составе пищи, животные способны усваивать большие количества углеводов, которые могут отлагаться в запас, окисляться с образованием АТР, превращаться в жирные кислоты для более эффективного депонирования энергии и, подобно тому как это происходит в растениях, использоваться в качестве исходного материала для синтеза множества разнообразных органических соединений. Хотя логически следовало бы начать обсуждение с метаболизма углеводов у представителей растений или микроорганизмов, наше изложение начинается с метаболизма углеводов у млекопитающих.

Лишь малая часть углеводов растительного царства доступна для питания человека. Из-за отсутствия соответствующих ферментов целлюлоза, ксиланы, пектины и др. не могут расщепиться до своих мономерных форм ни в просвете желудочно-кишечного тракта, ни в клетках тканей. Большая часть утилизируемых углеводов

поступает либо в виде крахмалов (амилоза и амилопектин), гликогена, либо в виде дисахаридов сахарозы, мальтозы или лактозы. В пищевых рационах смешанного животного и растительного происхождения содержится очень мало моносахаридов как таковых.

14.1. Переваривание углеводов пищи

Слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта играет роль барьера, препятствуя поступлению в нормальный организм крупных молекул, которые, если и всасываются, то недостаточно хорошо используются. *Переваривание* — это совокупность процессов ферментативного гидролиза больших молекул полисахаридов, белков, липидов, нуклеиновых кислот до более мелких компонентов, которые могут всасываться и затем подвергаться метаболическим превращениям.

14.1.1. Переваривание полисахаридов при участии слюны

Когда слюну инкубируют с крахмалом и через определенные интервалы времени производят иодную пробу смеси, цветная реакция, которая для исходной смеси дает синее окрашивание, постепенно меняет цвет до пурпурного, затем до красно-коричневого, и, наконец, проба вообще перестает давать окрашивание, когда слюнная α -амилаза (гл. 34) расщепляет все молекулы крахмала. Роль слюны в переваривании крахмала у интактного животного не совсем ясна, поскольку контакт фермента и субстрата может быть различным по продолжительности. После смешивания пищевого комка с кислым желудочным соком действие слюнной амилазы, которая инактивируется при низких значениях pH, несомненно прекращается.

Слюнная α -амилаза представляет собой смесь близких электрофоретически разделяемых изоферментов. Каждый из них — одноцепочечный полипептид (молекулярная масса 56 000), к которому присоединен олигосахарид. Структура этого олигосахариды, а также число его молекул на одну молекулу белка и способ прикрепления к белку неизвестны. Удивительно, что не существует соответствующих ферментов в слюне некоторых приматов, например у бабуинов или резусов.

14.1.2. Панкреатическая амилаза

В желудочном соке нет амилолитических ферментов. Единственные воздействия на крахмал во время его продвижения через желудок связаны с возможной остаточной активностью слюнной α -амилазы и, может быть, с некоторым гидролизом, который катализируется ионами водорода. Переваривание крахмала и гликоге-

на происходит главным образом в тонком кишечнике, и самый важный фермент, участвующий в этом процессе, — панкреатическая α -амилаза.

Панкреатическая α -амилаза (α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза) по некоторым свойствам напоминает слюнную α -амилазу; каждый из этих ферментов проявляет абсолютную потребность в Cl^- , стабилизируется Ca^{2+} и имеет оптимум pH $\sim 7,1$. Однако панкреатическая амилаза из тканей свиньи состоит из двух идентичных мономеров, связанных дисульфидным мостиком. Оптимальный pH в тонком кишечнике достигается в результате смешения кислого желудочного химуса со щелочными панкреатическими и желчными секретами. Действие α -амилаз на крахмал приводит к образованию смеси мальтозы, изомальтозы и глюкозы. α -Амилазы могут расщеплять интактную гранулу крахмала и не нуждаются в предварительном разрушении гранулы, например при приготовлении пищи. Поэтому непереваренные гранулы крахмала не часто встречаются в кале здоровых людей при обычном питании, но обнаруживаются в больших количествах в кале, когда панкреатическая амилаза не поступает в просвет кишечника с нормальной скоростью.

14.1.3. Перевариваемые и неперевариваемые полисахариды

В желудочно-кишечном тракте присутствуют ферменты, способные атаковать только полисахариды с α -1,4-связями. Так целлюлозная связь целлюлозы не атакуется ни одним из известных ферментов млекопитающих. Бактериальные *целлюлазы* способны вызывать расщепление целлюлозы у некоторых млекопитающих, особенно у наделенных рубцом или слепой кишкой большого размера; бактериальное переваривание целлюлозы в желудочно-кишечном тракте имеет важное значение в питании. У людей значение для питания целлюлозы, содержащейся в пище, ничтожно, и непереваренные растительные волокна обнаруживаются в кале. Не атакуются ферментами желудочно-кишечного тракта млекопитающих и растительные пентозаны. Однако некоторые пентозаны и другие полисахариды гидролизуются и частично расщепляются бактериями в толстом кишечнике с образованием CO_2 , спирта и органических кислот. Эти кислоты стимулируют перистальтику, в то время как оставшаяся неизменной целлюлоза служит в качестве балластного материала, или непереваренного остатка пищи, так что растительные полисахариды иногда употребляют как мягкие слабительные.

14.1.4. Переваривание олигосахаридов

Переваривание дисахаридов пищи и дисахаридов, образовавшихся в результате действия α -амилазы, заканчивается в тонком кишечнике. Этот процесс прослеживается в дистальном отрезке

двенадцатиперстной кишки, достигает максимума в тонких кишках и сохраняется на протяжении проксимального отрезка подвздошной кишки. Гидролиз дисахаридов происходит, однако, не в просвете кишечника, а в клетках слизистой оболочки. В экстрактах слизистой оболочки, подвергнутых фракционированию путем гель-фильтрации, обнаруживают несколько различных *α-специфичных олигосахаридаз* и три *β-специфичных олигосахаридазы*. В экстрактах слизистой кишечника обязательно присутствуют *мальтаза*, *изомальтаза*, которая может гидролизовать также палатинозу (глюкозо-*α*-1,6-фруктоза), и *сахараза*. Как мальтаза, так и изомальтаза изолированы частично в форме прочных комплексов с сахаразой (мол. масса 220 000 и 280 000) и, вероятно, в таком виде существуют *in situ*. Сахараза способна также гидролизовать *α*-1,4-глюкозиды, так что изомальтазно-сахаразный комплекс ферментов может медленно завершать полное переваривание гликогена и амилопектина. Недостаточность изомальтазно-сахаразного комплекса отмечается чаще, чем недостаточность каждого фермента в отдельности. Причина этого неясна, поскольку все три *β*-олигосахаридазы иммунологически совершенно различны.

Каждый из упомянутых ферментов находится в щеточной кайме эпителия слизистой оболочки в количествах, достаточных для нормального усвоения пищи у взрослого. Относительная активность слизистой оболочки кишечника при гидролизе этих субстратов выражается следующими числами: для мальтозы 100, сахарозы 30, изомальтозы 30, палатинозы 9, целлобиозы 2,5.

Кишечный эпителий содержит три различных фермента с *β*-галактозидазной активностью: *β*-галактозидазу с оптимумом pH при 4,5, *гетерогалактозидазу*, которая расщепляет олигосахариды смешанного строения по *β*-галактозидной связи, и истинную *лактазу*. Лактоза встречается только как компонент молока; ее концентрация в женском молоке почти в два раза выше, чем в коровьем молоке. У большинства млекопитающих активность лактазы ограничена даже в период вскармливания потомства и исчезает совсем после его прекращения. Максимальная активность лактазы у женщины составляет 10—15% активности мальтазы. Недостаточная активность лактазы может представлять серьезную проблему у детей. Если ребенка вскармливают грудью в течение продолжительного периода, поступление лактозы может достигать 30—40 г/сут и превышать лактазную мощность. Непереваренная лактоза недоступна ребенку и может вместо этого поддерживать развитие мощной и нежелательной кишечной флоры. Переход к коровьему молоку или к «смеси», включающей сахарозу, способствует преодолению этих затруднений.

Многие люди, в основном африканского или азиатского происхождения, страдают непереносимостью лактозы, что связано с

отсутствием лактазы, и подвержены желудочно-кишечным расстройствам после приема молока. Поскольку эти люди вообще способны к значительному потреблению молока без каких-либо симптомов заболевания во время младенчества и раннего детства, то развитие у них лактазной недостаточности, по-видимому, наступает не сразу после рождения. Непереносимость лактозы наблюдается также у детей с генетическим дефектом лактазы. Во всех случаях устранение лактозы из пищевого рациона представляет собой одновременно практически удобный и высокоэффективный способ снятия симптомов заболевания, вызываемых непереносимостью лактозы.

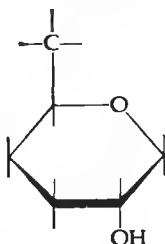
14.2. Всасывание углеводов в кишечнике

Как упоминалось выше, переваривание углеводов завершается дисахаридазами в щеточной кайме на мукозной поверхности клеток кишечника. Неясно, находятся ли образовавшиеся моносахариды тогда внутри клеток или все еще вне их. При нормальном питании дисахариды в крови человека практически отсутствуют; принимая во внимание невозможность дальнейших превращений дисахаридов в крови, можно считать, что олигосахариды проникают через кишечный эпителий лишь в редких случаях; это наблюдается либо при их аномально большом приеме, либо при генетическом дефекте специфической дисахаридазы. Напротив, глюкоза, галактоза и фруктоза, нормальные продукты переваривания, всасываются из просвета кишечника с высокой эффективностью, но с совершенно различными скоростями, а именно (по уменьшению скорости всасывания): галактоза > глюкоза > фруктоза > манноза > ксилоза > арабиноза.

Более медленно всасываемые члены этого ряда проникают через эпителий путем облегченного транспорта, что означает более высокую скорость всасывания, чем этого можно было бы ожидать на основании простой, свободной диффузии; вместе с тем при этом процессе устанавливается равновесие и указанные сахара не могут накапливаться против градиента концентрации. Суммарная эффективность всасывания поэтому зависит от удаления этих сахаров путем диффузии наружу, на серозную сторону клетки, откуда они быстро уводятся с током крови.

Напротив, глюкоза и галактоза, равно как и такие сахара, как 3-О-метилглюкоза, 1-дезоксиглюкоза, 6-дезоксиглюкоза и 6-дезоксигалактоза, могут концентрироваться против десятикратного градиента при участии активного транспортного механизма, что обеспечивает их раннее всасывание, несмотря на перистальтическое продвижение вниз по кишечному тракту и потребление нуждаю-

щейся в этих сахарах кишечной микрофлорой. Транспортируемые этой системой сахара имеют следующую общую структуру:



Такая транспортная система способна к насыщению и приблизительно подчиняется кинетике Михаэлиса — Ментен; система функционирует, только если в просвете кишечника одновременно имеется Na^+ ,двигающийся в том же направлении через щеточную кайму. Исходя из низкой $[\text{Na}^+]$ в цитозоле, можно заключить, что Na^+ должен двигаться «вниз», тем самым давая необходимую энергию для движения сахара «вверх». Однако истинная физическая взаимосвязь между этими процессами не доказана. Те же самые клетки обладают и Na^+ -зависимым механизмом всасывания различных аминокислот (гл. 21).

Поскольку различные транспортируемые сахара в принципе могут конкурировать за транспортную систему, то, очевидно, должен существовать переносчик со связывающим центром, придающим специфичность к сахарам, благодаря чему последние могут избирательно транспортироваться. Гликозид флоридзин — мощный ингибитор переноса сахаров, но не переноса Na^+ ; в его присутствии Na^+ продолжает накапливаться в клетке, продвигается через клетку и выходит из нее, в то время как глюкоза не проникает в щеточную кайму. Гликозид дигиталиса, убаин, — ингибитор Na^+ - K^+ -АТФазы, ответственной за процесс выброса Na^+ из клетки, благодаря чему поддерживается высокая внутриклеточная $[\text{K}^+]$ (разд. 11.3.2); этот гликозид также блокирует всасывание глюкозы, что объясняется возникающей в итоге неспособностью эпителиальных клеток переносить Na^+ с серозной стороны к плазме крови. Поскольку убаин фактически вызывает увеличение внутриклеточной $[\text{Na}^+]$ до наступления равновесия с $[\text{Na}^+]$ на мукозной стороне, градиент Na^+ снимается и транспорт глюкозы становится невозможным. Подобным образом добавление к кишечной щеточной кайме препаратов нигерицина, делающего возможным Na^+ / K^+ -обмен, также прекращает транспорт глюкозы с помощью этого механизма. Поскольку ни отсутствие Na^+ , ни присутствие флоридзина не оказывают влияния на всасывание глюкозы, происходящей из сахарозы или изомальтозы, представляется вероятным, что эти дисахариды поступают в клетки слизистой

оболочки в соответствии со своим собственным градиентом концентрации и подвергаются гидролизу внутри клетки.

Описанная система эффективно работает при низких концентрациях моносахаридов в просвете кишечника. Наряду с этим, по-видимому, имеется вторая система для облегченного транспорта больших количеств глюкозы или галактозы, функционирующая до тех пор, пока концентрации этих сахаров в просвете, перед щеточной каймой, значительно превышают концентрации внутри клеток. Нет никаких данных о возможном механизме выхода глюкозы на серозную сторону эпителиальной клетки; предполагается, что таким механизмом может быть простая диффузия по градиенту концентрации. При реабсорбции глюкозы в верхней части почечного канальца (гл. 35), при абсорбции глюкозы животными клетками в культуре, а также клетками *E. coli*, по-видимому, действует тот же механизм, что и при всасывании глюкозы клетками кишечного эпителия, а именно Na^+ -зависимая транспортная система.

Все еще неизвестна роль, если вообще существует таковая, *мутаротазной* активности в транспортных процессах в клетках животных. Белок, катализирующий этот процесс, широко представлен в корковом веществе почек и кишечном эпителии; он катализирует быстрое достижение равновесия между α - и β -формами глюкозы (разд. 2.2.2), равно как и между α - и β -формами других сахаров, транспортируемых Na^+ -зависимой системой. После введения α - или β -D-глюкозы непосредственно в почечную артерию в почечной вене устанавливается равновесие α - и β -форм, в то время как та часть глюкозы, которая фильтруется (но не реабсорбируется в канальцах) и достигает ворот почки, по-прежнему далека от равновесия. К этому следует добавить, что частично очищенная мутаротаза ингибируется флоридзином; K_i имеет одинаковый порядок и для почечной, и для кишечной систем всасывания. Число оборотов очищенной мутаротазы составляет $2,5 \cdot 10^4$ молекул глюкозы в секунду; количество этого фермента в почке таково, что 1 г (свежая масса) коркового вещества почек быка может катализировать мутаротацию 2 г глюкозы в минуту. По-видимому, мутаротация есть результат связывания глюкозы с белком-переносчиком; этот белок, будучи изолированным из мембраны, обладает мутаротазной активностью.

14.2.1. Поступление глюкозы в клетки

Концентрация свободной глюкозы в цитозоле большинства животных клеток исключительно низка, тогда как концентрация в плазме крови поддерживается близкой к 5 ммоль/л. Поступление глюкозы в клетки поэтому осуществляется в направлении падения

градиента. Оно происходит, однако, не как пассивная простая диффузия через беспорядочно расположенные поры мембраны, а как облегченный процесс, природа которого пока еще загадочна. Механизм этого процесса, который не нуждается в АТФ или Na^+ и нечувствителен к уабанину, очевидно, должен включать мембранный переносчик. У эритроцита соответствующий белок, по-видимому, встроен в мембрану, и при том так, что он гликозилируется на той стороне молекулы, которая обращена наружу и где находится доступная сульфгидрильная группа; подсчитано, что на одну клетку приходится $2 \cdot 10^5$ таких центров, каждый из которых переносит более 500 молекул глюкозы в секунду.

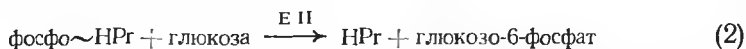
Такая система действует в мышце и мозге; особый случай представляет собой поступление глюкозы в клетки печени, которое может осуществляться путем простой пассивной диффузии. Это тот самый облегченный механизм, который стимулируется инсулином (разд. 15.6.2). В общем случае скорость поступления глюкозы в скелетную мышцу при тех очень высоких концентрациях глюкозы, которые наблюдаются в плазме крови больных тяжелой формой диабета, в присутствии инсулина приближается к скорости поступления при нормальных концентрациях. Эритроциты птиц и ретикулоциты млекопитающих, однако, могут обладать дополнительной системой активного транспорта, поскольку поступление глюкозы у этих клеток чувствительно к цианиду и динитрофенолу, прекращающим образование АТФ в митохондриях.

Исследования бактериальных клеток интересны, поскольку у большинства бактерий проникновение различных моносахаридов через клеточную мембрану происходит очень медленно, если не присутствует специфический механизм переноса. Известны разнообразные системы этого типа; некоторые из них, по-видимому, не нуждаются в метаболической энергии, в то время как другие, вероятно, утилизируют АТФ, генерируемый при транспорте электронов в определенным образом организованной мембране (гл. 12).

Наиболее тщательно изучена *фосфотрансферазная система*, получающая свою энергию непосредственно из фосфоенолпирувата, а не из АТФ. В таких организмах, как *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, транспорт глюкозы совершается путем согласованного действия трех белков. Два из них, фермент I и небольшой белок (мол. масса 9400), обозначаемый как НРг, — это цитоплазматические белки; третий, фермент II, локализован в клеточной мембране. В первой стадии реакционной последовательности фермент I катализирует перенос фосфата от фосфоенолпирувата к N-1 гистидинового остатка НРг:



Вторая стадия, катализируемая ферментом II, происходит в мембране и заключается в переносе фосфата от НРг на транспортируемый сахар, т. е. глюкозу



У *E. coli* фермент II состоит из двух неодинаковых субъединиц: IIA, в которой заложена специфичность к сахару, и IIB, которая катализирует перенос фосфорильного остатка от фосфо $\sim$ НРг к сахару, вероятно связанному с IIA.

В ходе этой реакции фермент II, по-видимому, подвергается некоторой транслокации внутри мембраны таким образом, чтобы внешняя глюкоза превратилась во внутренний глюкозо-6-фосфат, доступный дальнейшему метаболизму. Мутации (гл. 25) генов, кодирующих синтез ферментов I или НРг, плейотропны; это означает, что мутации приводят к неспособности транспортировать многие сахара. Напротив, клетки с мутациями в гене для субъединицы IIA фермента II, которая специфична для данного сахара, неспособны транспортировать только этот определенный сахар.

Кроме фосфотрансферазной системы *E. coli* и другие бактерии обладают еще системой для активного транспорта сахаров, сопряженной с переносом электронов. В этом случае фосфорилирование сахара не происходит.

14.3. Метаболизм углеводов. Некоторые общие положения

Принимаемые с пищей углеводы обеспечивают материал для синтеза очень разнообразных органических соединений, найденных у животных: стероидов, аминокислот, пуринов, пиримидинов, сложных липидов, полисахаридов и т. д. Последовательности реакций, через которые совершаются эти превращения, и участвующие в них ферменты рассмотрены в последующих главах. Прежде всего следует обратить внимание на те процессы, благодаря которым принимаемые углеводы — преимущественно глюкоза — используются для удовлетворения энергетических потребностей клеток животных. Центральную роль глюкозы можно успешно связать с тремя ее химическими свойствами (гл. 2): высокая растворимость (причем раствор глюкозы не содержит ионов); доступная для реагирования карбонильная группа, которая защищена благодаря образованию внутреннего полуацетала; оптимальная стабильность шестичленного пиранозного кольца, в котором все гидроксидные группы располагаются экваториально.

Сильно упрощенная схема этого центрального процесса жизнедеятельности представлена на рис. 14.1, где показаны лишь клю-

чевые превращения углеродных скелетов, образующихся при метаболизме глюкозы соединений. Остановимся на некоторых общих свойствах, характерных для указанной последовательности реакций.

1. Для глюкозы, как таковой, существует единственное главное превращение: фосфорилирование до глюкозо-6-фосфата.
2. Последующие реакции, ведущие от любого ключевого промежуточного продукта к какому-нибудь конечному продукту, обозначаются как *путь*, например превращение глюкозо-6-фосфата через пути 8, 9, 11, 12, 13, 14 до лактата.
3. Все пути осуществляются с потерей свободной энергии. Используя тот же пример, можно показать, что образование 2 молей лактата из глюкозо-6-фосфата сопровождается синтезом 4 молей АТФ; суммарное изменение свободной энергии составит $\Delta G^\circ = -22\,000$ кал/моль. Хотя лактат может вновь превратиться в глюкозо-6-фосфат, однако не путем обращения той же последовательности реакций. Функционально обратный путь (реакции 14, 28, 29, 12, 11, 10, 8) включает введение шести молекул АТФ на молекулу образуемого глюкозо-6-фосфата. Таким образом, в результате каждого процесса теряется свободная энергия, т. е. в обоих случаях ΔG° процесса велика и отрицательна. Сразу же становится очевидным, что образование лактата может происходить при условии расходования АТФ в ходе других реакций, в то время как обратный процесс маловероятен, если только клетка не обладает избытком АТФ.
4. Для всех клеток главная форма доступной энергии представлена в виде АТФ; в большинстве клеток принципиальный механизм генерации АТФ состоит в окислении NADH митохондриальной электронпереносящей системой с сопряженным фосфорилированием ADP. Главные восстановители NAD⁺ для этого процесса — интермедиаты путей цикла лимонной кислоты 16, 21, 23, 25, 29 (гл. 12) и жирные кислоты пути 17 (гл. 17).
5. Клетки обычно не могут запасать ни глюкозу, ни глюкозо-6-фосфат. Легко доступная запасная форма углеводов, в особенности в печени и скелетной мышце, представлена гликогеном, который образуется из глюкозо-1-фосфата по одному пути и распадается по другому пути.
6. Энергия депонируется главным образом в жирных кислотах нейтральных триацилглицеринов. Хотя жирные кислоты имеются в большинстве клеток, образуются они из глюкозо-6-фосфата (в процессах 8, 9, 11, 12, 13, 16 и 17) в первую очередь в печени и жировой ткани; из последней они могут быть возвращены в печень. В то время как по этой последовательности $\frac{2}{3}$ углерода глюкозы переводится в жирные кислоты, механизма, с помощью которого клетки животных смогли бы осуществ-

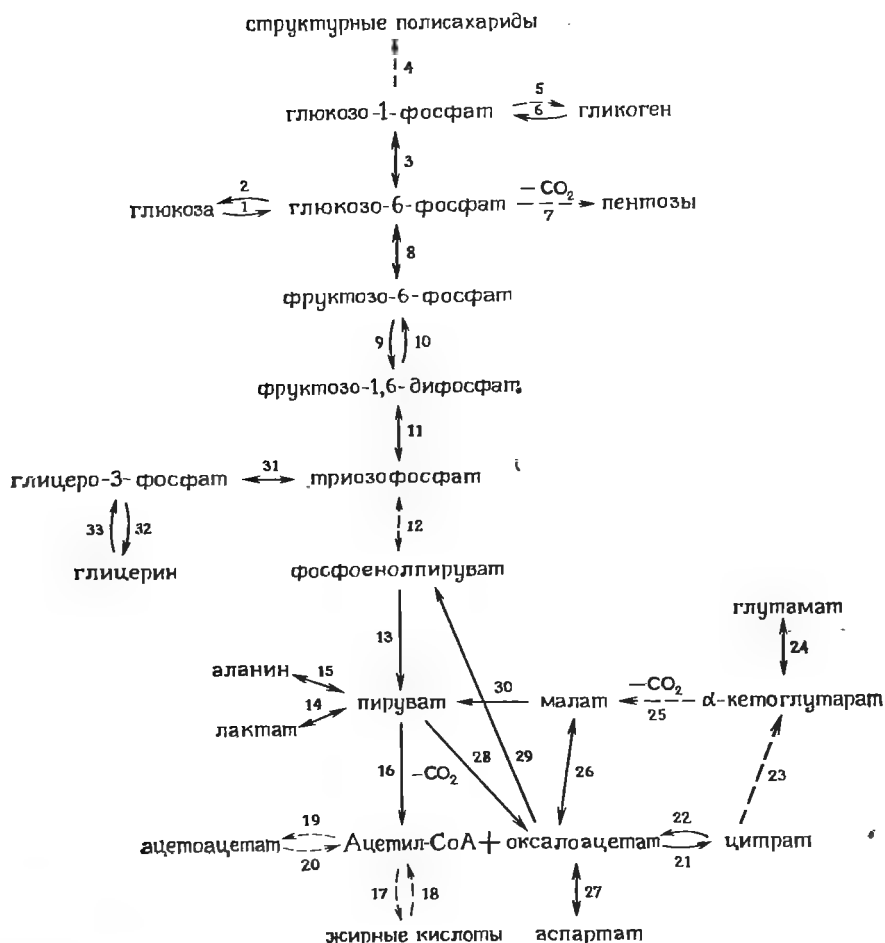


Рис. 14.1. Схема некоторых главных метаболических превращений. Не показаны адениновые нуклеотиды и пиридиннуклеотиды, участвующие в этих процессах, а также многочисленные промежуточные продукты, образующиеся в каждой последовательности, отмеченной штриховой стрелкой. Двухсторонняя стрелка означает, что процесс, будь то одна или несколько реакционных стадий, катализируется одним и тем же ферментом в обоих направлениях. Обычные стрелки (в одном направлении) свидетельствуют о реакции или последовательности реакций, практически проходящих в значительных масштабах только в показанном направлении. Пара противоположно направленных закругленных стрелок означает, что различные ферменты оперируют в этих двух направлениях и что, как правило, несколько или все промежуточные продукты (неприведенные на схеме) неодинаковы в обоих процессах.

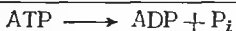
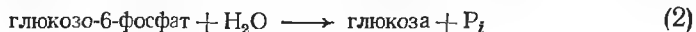
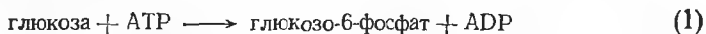
вить прямое превращение углерода жирных кислот в углеводы, не существует. Однако такой механизм имеется у растений и некоторых микроорганизмов; он описывается последовательностью реакций (разд. 14.9). Общее потребление энергии в виде АТФ-эквивалентов для пути 17 превышает почти на 20% количество АТФ, вырабатываемого в пути 18. Такова цена, которую приходится платить за депонирование энергии. Очевидно, что каждый из этих путей осуществляется с большим отрицательным изменением свободной энергии.

7. В схеме не показано, как эти взаимосвязанные процессы распределяются в клетке. Превращение глюкозы в лактат (пути 1, 8, 9, 11, 12, 13 и 14) происходит исключительно в цитозоле. Цикл лимонной кислоты (пути 16, 21, 23, 25 и 26) и окисление жирных кислот до ацетил-СоА (путь 17) протекает в митохондриях и сопровождаются восстановлением NAD^+ в NADH . Синтез жирных кислот, однако, происходит в частицах цитозоля, и в качестве восстановителя используется NADPH . Этот процесс частично обеспечивается ферментами цитозоля, ответственными за пути 7 и 21, но, кроме того, требуется поступление NADPH из митохондрий. В синтезе глюкозы из аминокислот или лактата функционирует по крайней мере один митохондриальный фермент, а также несколько ферментов цитозоля.
8. Более грубая форма компартментализации связана с неодинаковыми метаболическими потребностями клеток различных органов. Почти постоянная потребность в больших количествах АТФ в сокращающейся мышце вызывает усиленное превращение гликогена в лактат (пути 6, 3, 9, 11, 12, 13 и 14), в то время как большая часть энергетических потребностей скелетной мышцы в состоянии покоя, подобно потребностям сердца или почек, обеспечивается окислением ацетоацетата (путь 20 и цикл лимонной кислоты), поступающего из печени через кровь. Стало быть, значительная часть метаболической активности печени должна быть направлена на продуцирование ацетоацетата либо из гликогена (пути 6, 3, 8, 9, 11, 12, 13, 16 и 19), либо из жирных кислот (пути 17 и 18), получаемых из жировой ткани.
9. Мозг и сокращающаяся скелетная мышца нуждаются в непрерывном притоке глюкозы, которая у животного, находящегося в состоянии сытости, доставляется в первую очередь из печени. Способность гидролизовать глюкозо-6-фосфат до глюкозы (путь 2) свойственна только печени, а также эпителию почечных канальцев и кишечника, где эта реакция связана с освобождением абсорбированной глюкозы. Поскольку резерв гликогена в печени ограничен, голодное животное должно обладать способностью синтезировать углеводы из неуглеводных предшественников; этот процесс называется *глюконеогенезом*.

Предшественниками углеводов являются аминокислоты, которые поступают из путей 15, 24, 27 и последующих, глицерин из нейтральных триацилглицеринов, который поступает из путей 33 и 31, и лактат, транспортируемый в печень из сокращающейся скелетной мышцы.

10. Каждый из этих разнообразных процессов должен происходить со скоростью, соизмеримой с потребностями индивидуальной клетки. Поверхностное ознакомление со схемой может создать впечатление, что каждый из этих процессов осуществляется постоянно, как в действительности до некоторой степени это и имеет место. Однако относительные скорости различных путей должны регулироваться таким образом, чтобы конечный результат всего происходящего соответствовал запросам клетки. Весьма редко какой-либо путь осуществляется с максимальной скоростью, поскольку такие процессы возможны, только если бы все участвующие в данном пути ферменты функционировали с $V_{\max}$. Было бы в самом деле биологически бесполезно (растрачивание АТР), если гликолитический путь (превращение глюкозо-6-фосфата до лактата) реализовался бы с максимальной скоростью в печеночной клетке, занятой в этот момент чистым глюконеогенезом с целью экспорта глюкозы.

Не является выгодным для клетки одновременно заниматься усиленным синтезом жирных кислот и их окислением (пути 16 и 17). Такой процесс носит название *бесполезный цикл*, так как в результате ничего не достигается, кроме растрачивания прибыли в АТР, возникающей при одном процессе, за счет использования АТР в другом процессе. Возможности бесполезных циклов бесчисленны; простейшая из них приведена на рис. 14.1 и представлена следующими реакциями:



Ясно, что при одновременном протекании обеих реакций создавался бы бесполезный цикл, который являлся бы не чем иным, как эквивалентом работающей впустую АТРазы. Однако, хотя и тот и другой вариант реакций необходимы печеночной клетке, реакция (1) должна реализовываться с максимальной скоростью, когда партия глюкозы поступает в портальную вену, а реакция (2) — когда активность сокращающейся мышцы снижает содержание глюкозы в крови.

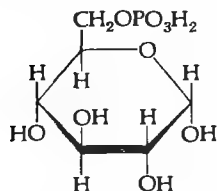
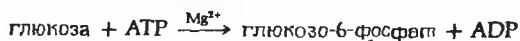
Действительно, эти различные процессы регулируются таким образом, что каждый происходит со скоростью, точно соответствующей существующим условиям. Это становится возможным благодаря большому разнообразию механизмов: отсутствию необходи-

мого компонента реакции, подавлению фермента каким-либо продуктом пути, стимулированию фермента одним из более ранних интермедиатов пути или по сигналу, получаемому в форме гормона от другого органа. Такие регуляторные явления создают возможность тонких и очень быстрых модуляций рассматриваемых процессов. Более медленный контроль может достигаться путем изменения количества ключевого фермента. Таких примеров много, и они часто встречаются далее.

14.3.1. Глюкозо-6-фосфат

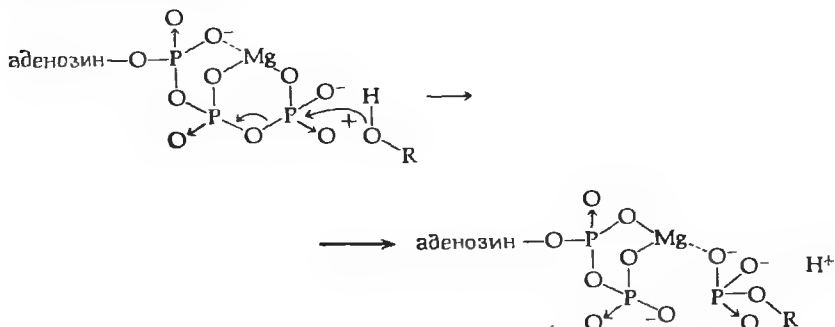
14.3.1.1. Фосфорилирование глюкозы

Все клетки, способные метаболизировать глюкозу, содержат какую-либо форму *гексокиназы* (мол. масса 104 000); фермент состоит из двух идентичных субъединиц и катализирует реакцию



α -D-глюкозо-6-фосфат

Большинство гексокиназ до известной степени неспецифичны, проявляя некоторую способность катализировать также образование 6-фосфатных эфиров маннозы, фруктозы и галактозы. Истинным субстратом является Mg^{2+} -хелат АТР ($\text{Mg}^{2+}\text{-ATP}^{4-}$). Атом кислорода сложноэфирной связи принадлежит исходной гидроксидной группе гексозы. Предполагается следующий механизм реакции (R-OH —глюкоза):



Эта реакция практически необратима, $\Delta G^\circ = -5000$ кал/моль, что объясняется относительно низкоэнергетической природой глюкозо-6-фосфата и более низкой стабильностью комплекса $Mg^{2+}-ADP^{3-}$ в сравнении с $Mg^{2+}-ATP^{4-}$. Ткани животных содержат семейство гексокиназ, лучше всего выявляемых благодаря различиям их $K_m^{глюкоза}$; однако значения $K_m^{глюкоза}$ для всех гексокиназ очень невелики и составляют 1—10 мкмоль/л.

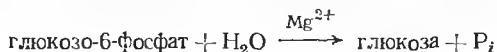
Наиболее важным свойством гексокиназы является ее ингибирование продуктом реакции глюкозо-6-фосфатом, что объясняется связыванием этого сложного эфира в определенном регуляторном центре, и несколько менее выраженное ингибирование ADP. При физиологических концентрациях обоих веществ реакция могла бы протекать со скоростью, составляющей лишь 5% V_{max} , если бы не положительная эффекторная активность $Mg^{2+}-ATP^{4-}$ и P_i . Во всех клетках часть гексокиназы довольно прочно связана с наружной митохондриальной мембраной; в тканях мозга это, наверное, может отнестись к половине всего количества фермента.

Вторым ферментом, катализирующим указанную реакцию, является *глюкокиназа* (мол. масса от $15 \cdot 10^5$ до $20 \cdot 10^5$), которая в отличие от гексокиназы не ингибируется глюкозо-6-фосфатом и характеризуется значительно более высокими $K_m^{глюкоза}$ (~ 20 ммоль/л). Это преобладающий фермент во взрослой печени; не исключено даже, что вся гексокиназа взрослой печени находится в непаренхиматозных клетках. Печень крысиного эмбриона содержит только гексокиназу, концентрация которой начинает уменьшаться приблизительно за четверо суток до рождения.

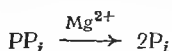
Глюкокиназа появляется спустя две недели после рождения и не достигает уровня, характерного для взрослого организма, до достижения животным месячного возраста. Это может коррелировать с тем фактом, что во время утробной жизни глюкоза в крови обеспечивается плацентой; глюкокиназа, которая не ингибируется глюкозо-6-фосфатом, появляется с того момента, как возникает необходимость улавливания печенью всей глюкозы, поступающей через портальную вену, независимо от концентрации глюкозо-6-фосфата в цитозоле печеночных клеток; эта глюкоза удерживается далее в виде гликогена или превращается в жирные кислоты. Печеночный синтез глюкокиназы может быть вызван почти на 10 сут ранее нормального срока введением определенного стероида коры надпочечников (гл. 45), но никак не раньше, поскольку до этого времени процесс репрессирован эстрогеном, проникающим через плаценту из материнского кровотока (гл. 44). Отметим отсутствие глюкокиназы в печени жвачных животных, у которых углеводы корма сбраживаются бактериями в сычуге (четвертый желудок) до короткоцепочечных жирных кислот (уксусная, пропионовая, масляная), и именно они, в большей степени, чем глюкоза, направляются в печень.

14.3.1.2. Гидролиз глюкозо-6-фосфата

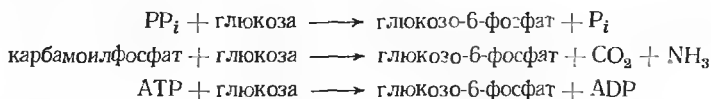
Глюкозо-6-фосфат, подобно всем другим фосфорилированным интермедиатам, «заперт» в клетке, будучи не способным проходить через цитоплазматическую мембрану. Как отмечалось выше, имеются, однако, три ткани, клетки которых должны быть способны выделять глюкозу в кровоток, а именно ткани печени и эпителий почечных канальцев и тонкого кишечника. Это становится возможным благодаря действию необычного, недостаточно изученного фермента *глюкозо-6-фосфатазы*, который катализирует реакцию



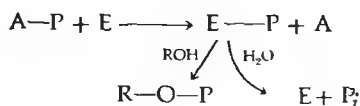
Этот фермент погружен в липиды эндоплазматической сети, и его полная очистка с освобождением от липидов до сих пор еще не завершена. Тот же фермент, однако, катализирует со скоростью, ориентировочно сопоставимой с таковой при гидролизе глюкозо-6-фосфата, и гидролиз неорганического пиррофосфата



и серию реакций переноса, таких, как



Когда фермент освобождается от своего нормального липидного окружения, главная гидролитическая активность уменьшается и значительно возрастает способность катализировать различные реакции переноса. Физиологическое значение этого свойства фермента, если таковое вообще имеется, остается неизвестным. Имеющиеся данные указывают на то, что механизм реакции включает начальный перенос фосфата на N-3 гистидинового остатка фермента:



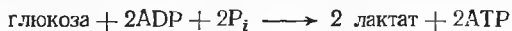
Мало известно о регуляции этого фермента, в частности о причине его неспособности гидролизовать весь глюкозо-6-фосфат, протекающий через клетку. У здоровых крыс активность печеночной глюкозо-6-фосфатазы примерно в 10 раз превышает активность глюкокиназы, и она возрастает еще больше у животных на богатом углеводами рационе и при диабете. Таким образом, неясно, какие факторы предотвращают непрерывный бесполезный цикл фосфо-

рилирования и гидролиза. Возможно, что гидролитически активный фермент располагается векторно в стенке эндоплазматической сети таким образом, чтобы после гидролиза вся глюкоза обязательно вошла в каналы этого ретикулярного образования и перешла в интерстициальную жидкость, омывающую клетки, тем самым избегая дальнейших превращений. Кроме того, может существовать и какое-то переключающее устройство — связывание некоторого неидентифицированного эффектора, который определяет, действует ли фермент как гидролаза или как фосфорилирующая система.

14.4. Гликолиз

Скорость, с которой должна генерироваться АТФ, чтобы обеспечить потребности таких тканей организма, как мозг, почки, селезенка, а также потребности костной и соединительной ткани, кожи и даже тканей печени, относительно постоянна. В этих тканях, как и в скелетной и сердечной мышцах находящегося в состоянии покоя организма, потребности в энергии удовлетворяются за счет АТФ, образующегося при митохондриальном окислении NADH, хотя, как уже указывалось, поступивший «топливный материал» может быть ацетоацетатом, жирными кислотами или глюкозой, которые все превращаются в ацетил-СоА, поступающий в цикл лимонной кислоты (рис. 14.1). Однако скорость потребления АТФ в сердечной мышце может внезапно возрасти даже в 10 раз, а в работающей скелетной мышце — более чем в 100 раз. Эти жесткие требования до некоторой степени удовлетворяются благодаря максимальному окислению в митохондриях, но даже в том случае, если максимальная митохондриальная активность отвечала бы существующим запросам, она была бы ограничена притоком O_2 и глюкозы до того момента, пока кровообращение не было бы соответствующим образом отрегулировано. При таких обстоятельствах скелетная мышца и в меньшей мере сердечная мышца получают необходимое большое дополнительное количество АТФ в результате функционирования последовательности реакций называемой *гликолизом*, т. е. процессу, который использует всю последовательность в норме приводящую к пирувату, но в которой последний, вместо того чтобы окисляться в митохондриях, восстанавливается в лактат в цитозоле. Эти взаимоотношения показаны на рис. 14.1 и представляют отведение пирувата от пути 16 к пути 14 этой схемы.

Если бы последовательность начиналась с глюкозы, как таковой, то суммарный результат должен был бы выглядеть как



Преимущество, которое мышца получает от этого, казалось бы лимитированного, процесса, основано на том, что он не нуждается

в кислороде и может, как будет показано в дальнейшем, в равной мере легко и быстро утилизировать запасы гликогена клетки так, что сокращающаяся мышца в течение некоторого времени не зависит от скорости подачи глюкозы из крови; существенно, что ферменты, позволяющие реализоваться всем этим событиям, в избытке присутствуют в цитозоле мышечной клетки.

В действительности этот процесс (рис. 14.2) идентичен таковому в анаэробных организмах, участвующих в процессах брожения при изготовлении кислой капусты, кислого молока и близко родственен процессам брожения у ряда других микроорганизмов, когда также образуется АТР, но конечными продуктами являются не молочная кислота, а этанол, ацетон или пропионовая кислота. Случайное наблюдение (в 1890 г.) братьев Бухнер, что бесклеточные экстракты дрожжей могут катализировать спиртовое брожение, послужило основанием для изучения химизма физиологических процессов вне клетки, что нашло свое развитие в последующих работах Гардена и Йонга. Принимая во внимание эти исторические факты, а также то, что понимание спиртового брожения ведет к пониманию гликолиза и действия «путей» в целом, целесообразно более подробно рассказать о наблюдениях Гардена и Йонга над спиртовым брожением экстрактов пекарских дрожжей.

1. Неорганический фосфат был необходим для брожения, которое останавливалось при истощении запаса фосфата в системе.
2. По мере брожения накапливался гексозодифосфат. Суммарный процесс описывается следующим уравнением:



3. Если фосфат заменяли на арсенат, гексозодифосфат не накапливался и брожение продолжалось до тех пор, пока вся глюкоза не превращалась в этанол и CO_2 .
4. Экстракт можно было разделить на термолабильную белковую фракцию и диализуемую фракцию; последняя в качестве незаменимых компонентов содержала Mg^{2+} и какое-то органическое вещество, названное *козимазой* и впоследствии идентифицированное как NAD.

После того как исследования А. Хилла показали, что превращение гликогена в молочную кислоту близкородственно процессу мышечного сокращения, Мейергоф приготовил растворимые экстракты мышц, которые катализировали гликолиз, и позднее продемонстрировал, что, за исключением конечных стадий, гликолиз и спиртовое брожение, по существу, подобны. Эти процессы и их ферментные компоненты с тех пор интенсивно изучались. В табл. 14.1 даются названия и некоторые характеристики ферментов, участвующих в гликолизе.

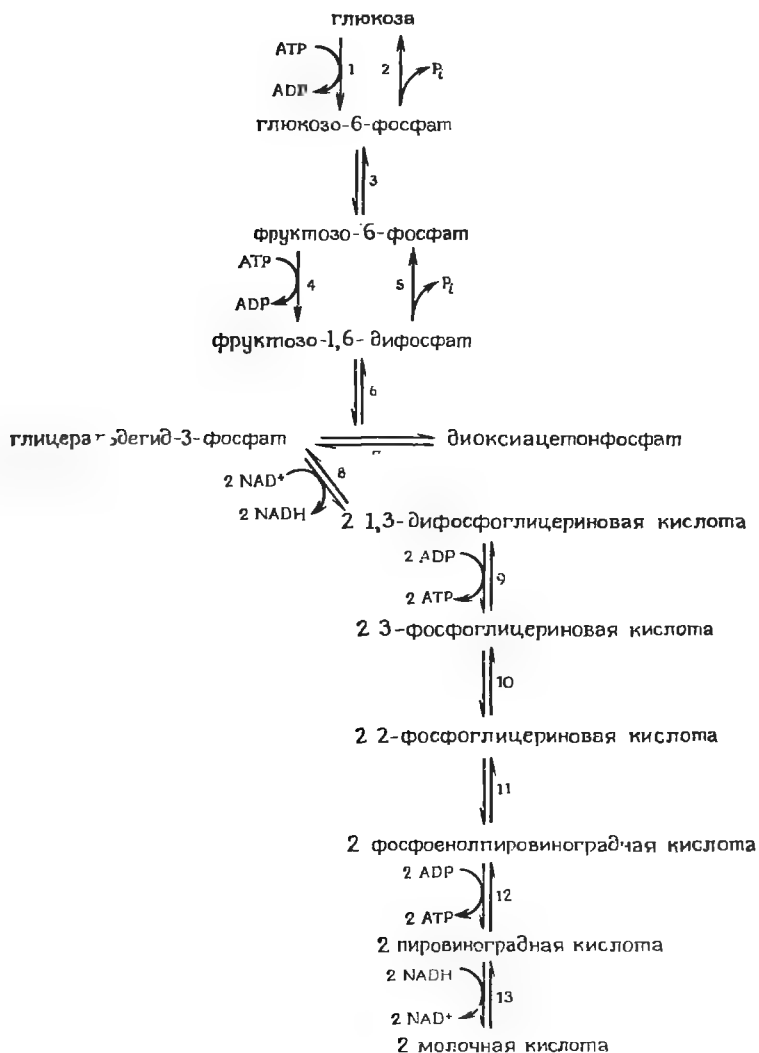


Рис. 14.2. Реакции гликолиза. Числа около стрелок относятся к участвующим ферментам, указанным в табл. 14.1.

Таблица 14.1
Ферменты гликолиза

Поряд- ковый номер ^a	Фермент	Коферменты и кофакторы	Активаторы	Ингибиторы	K'_{eq} (рН 7,0)	ΔG° , кал/моль
1	Гексокиназа, глю- токиназа	Mg^{2+}	Mg^{2+} -АТР ⁴⁻ , Р	Глюкозо-6- фосфат, АDP	$\frac{[\text{глюкозо-6-фосфат}][Mg^{2+}\cdot ADP^3-]}{[\text{глюкоза}][Mg^{2+}\cdot ATP^4-]} = 650$	-4 000
2	Глюкозо-6-фосфа- таза	Mg^{2+}			$\frac{[\text{глюкоза}][P_i]}{[\text{глюкозо-6-фосфат}]} = 210$	-3 300
3	Фосфоглюкоизо- мераза	Mg^{2+}			$\frac{[\text{фруктозо-6-фосфат}]}{[\text{глюкозо-6-фосфат}]} = 0,5$	+400
4	Фосфофруктоки- наза	Mg^{2+}	P_i , АМР, Mg^{2+} -АТР ⁴⁻ , АDP, сАМР, цитрат K^+ , NH_4^+		$\frac{[\text{фруктозо-1,6-дифосфат}]}{[\text{фруктозо-6-фосфат}][Mg^{2+}\cdot ATP^4-]} = 220$	-3 400
5	Фруктозо-1,6-ди- фосфатаза		F ⁻ , АМР		$\frac{[\text{фруктозо-6-фосфат}][P_i]}{[\text{фруктозо-1,6-дифосфат}]} = 650$	-4 000
6	Альдолаза	Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} ^a	Цистеин ⁶ , PP_i ⁶		$\frac{[\text{глицеральдегид-3-фосфат}] \times [\text{диоксинацетонфосфат}]}{[\text{фруктозо-1,6-дифосфат}]} = 10^{-4}$	+5 700
7	Фосфотриозонизо- мераза	Mg^{2+}	P_i , глици- дол-фосфат ⁶		$\frac{[\text{глицеральдегид-3-фосфат}]}{[\text{диоксинацетонфосфат}]} = 0,075$	+1 800
8	Глицеральдегид- фосфатдегидроге- наза	NAD	Арсенат	Иодоацетат ⁶	$\frac{[1,3\text{-дифосфоглицерат}][NADH]}{[\text{глицеральдегид-3-фосфат}][NAD^+][P_i]} = 0,08$	+1 500

9	Фосфоглицерат-киназа	Mg^{2+}	$\frac{[3\text{-фосфоглицерат}][Mg^{2+}\text{-АТР}^4-]}{[1,3\text{-дифосфоглицерат}][Mg^{2+}\text{-АДР}^3-]} = 1500$	$-4\ 500$
10	Фосфоглицеромутаза	Mg^{2+} , 2, 3-дифосфоглицерат	$\frac{[2\text{-фосфоглицерат}]}{[3\text{-фосфоглицерат}]} = 0,02$	$+1\ 000$
11	Енолаза	Mg^{2+} , Mn^{2+}	$\frac{[\text{фосфоенолпируват}]}{[2\text{-фосфоглицерат}]} = 0,5$	$+400$
12	Пируваткиназа	K^+ , фруктозо-1,6-дифосфат	$\frac{[\text{пируват}][Mg^{2+}\text{-АТР}^4-]}{[\text{фосфоенолпируват}][Mg^{2+}\text{-АДР}^3-]} = 2 \cdot 10^{-5}$	$-7\ 500$
13	Лактатдегидрогеназа	NAD	$\frac{[\text{лактат}][NAD^+]}{[\text{пируват}][NADH]} = 1,6 \cdot 10^4$	$-6\ 000$

а Порядковый номер фермента соответствует номеру реакции на рис. 14.2.

б Лабораторный реактив.

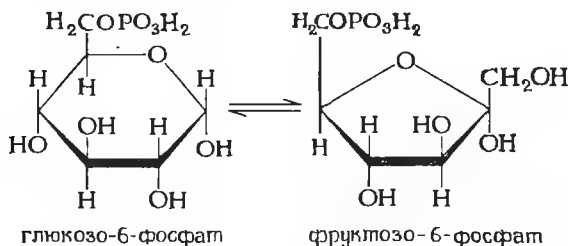
в Для дрожжевого, но не для мышечного фермента.

г Для фермента из эритроцитов.

д Только изофермент взрослого.

14.4.1. Фруктозо-6-фосфат

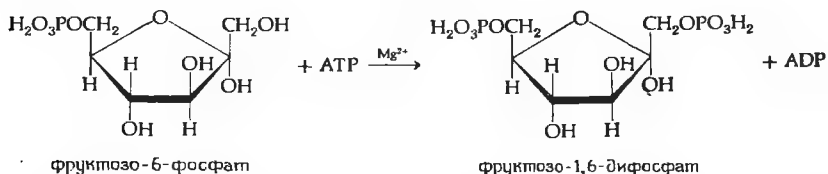
Глюкозо-6-фосфат превращается в фруктозо-6-фосфат в результате легко протекающей в обоих направлениях реакции, катализируемой *фосфоглюкоизомеразой*; при равновесии отношение альдозы к кетозе составляет 7:3. Фермент человека (мол. масса 134 000) представляет собой димерный белок из идентичных или почти идентичных субъединиц и, согласно ряду данных, существует в форме нескольких изоферментов. Эта изомеризация 6-фосфатов глюкозы и фруктозы напоминает катализируемую щелочью изомеризацию глюкозы в фруктозу и маннозу (гл. 2). Связываемыми с ферментом субстратами являются α -аномеры D-сахарофосфатов в их C-1-конформации (конформация кресла, все заместители от C-2 до C-5 экваториальные). Поскольку процесс должен включать ендольный интермедиат, кольцо полуацетала должно открываться и закрываться, будучи связанным с ферментом.



14.4.2. Фруктозо-1,6-дифосфат

14.4.2.1. Фосфофруктокиназа

Пусковой реакцией в гликолитической последовательности, по существу, является фосфорилирование фруктозо-6-фосфата с образованием фруктозо-1,6-дифосфата, того самого гексозодифосфата, накопление которого было обнаружено в экспериментах Гардена и Йонга.



Фосфофруктокиназы изолированы из различных животных тканей, дрожжей и бактерий; все они обладают, в общем похожими

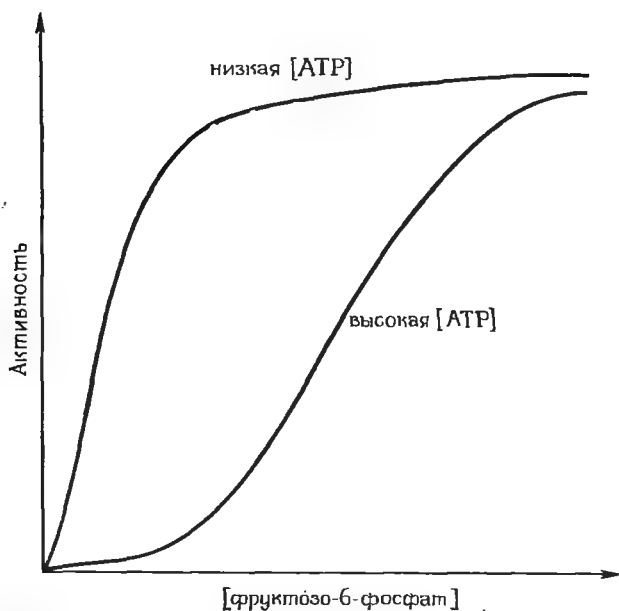


Рис. 14.3. Влияние концентрации АТФ на кинетику реакции, катализируемой фосфофруктокиназой.

свойствами. Ферменты (мол. масса от $3 \cdot 10^5$ до $6 \cdot 10^5$) склонны к агрегации в более крупные полимерные образования. Молекула фермента построена из субъединиц четырех видов, каждый из которых представлен более чем одной субъединицей, несущей один каталитический центр. Ферменты мышцы и печени существенно различаются по своим физическим и кинетическим свойствам; фермент эритроцитов очень похож на фермент печени. При одном из врожденных заболеваний фосфофруктокиназа в мышце фактически отсутствует, в то время как ферменты печени и эритроцитов сохраняются; низкая остаточная активность фосфофруктокиназы в мышце, возможно, вызвана присутствием небольших количеств «печеночного фермента», синтезируемого в мышце.

Ключевая роль фосфофруктокиназы в процессе гликолиза определяется ее регулируемыми кинетическими свойствами. На активность сильно влияют различные эффекторы, действующие таким образом, что реакция идет, когда клетка нуждается в АТФ, и сильно ингибируется, когда адениновые нуклеотиды клетки находятся главным образом в форме АТФ. В отсутствие таких эффекторов и при низкой [АТФ] зависимость скорости реакции от концентрации фруктозо-6-фосфата по существу описывается гиперболой. При более высоких [АТФ] кривая становится сигмоидной (рис. 14.3.).

В этом случае кооперативность центров, связывающих субстрат, есть следствие связывания в модифицирующих или же в аллостерических центрах отрицательного эффектора Mg^{2+} -АТР⁴, который является также субстратом; в результате увеличивается K_m для фруктозо-6-фосфата. При промежуточных [АТР] цитрат усиливает этот эффект АТР; стало быть, все более высокие концентрации обоих субстратов требуются, если реакция должна продолжаться. По-видимому, центр ингибирования может занимать или АТР, или цитрат. При любой концентрации отрицательного эффектора эти вызываемые АТР или цитратом воздействия ослабляются рядом положительных эффекторов, а именно АМР, АДР и Р_i; наиболее эффективен АМР. В отсутствие ингибирования, вызванного АТР, т. е. при низкой [АТР], положительные эффекторы неэффективны; предполагают, что они каким-то образом разряжают отрицательные эффекторы, возможно простой заменой. Связывание этих эффекторов свидетельствует о наличии той же кооперативности, как и при связывании субстрата, т. е. связывание второй молекулы эффектора происходит быстрее, чем связывание первой, и т. д.

Мышечный и дрожжевой ферменты нуждаются в присутствии K^+ или NH_4^+ . Последний снижает K_m как для фруктозо-6-фосфата, так и для АТР. Совокупность этих эффектов K^+ и NH_4^+ может либо усилить, либо выключить действие фермента в пределах физиологических концентраций различных главных эффекторов, контролирующих его функцию.

Фосфофруктокиназа *Entamoeba histolytica*, называемая 6-фосфофруктокиназой (РР_i), необычна в том отношении, что она использует неорганический пироглюкаты, а не АТР в качестве донора фосфата:



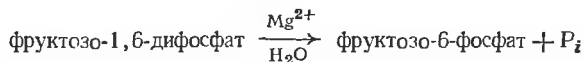
Внутриклеточная концентрация РР_i у этого организма составляет 0,18 ммоль/л, т. е. значительно превышает $K_m^{\text{РР}_i}$ для этого фермента; поэтому реакция протекает со значительной скоростью.

Печень содержит две изоферментные формы фосфофруктокиназы; минорная форма, очевидно, идентична с главенствующей формой мышечного фермента. Присутствует также небольшой полипептид, который активизирует главный изофермент L₂, связываясь с его молекулой на каком-то ином участке, чем тот, на котором эффективен АМР. Будучи связанным таким образом, этот полипептид способствует увеличению устойчивости фермента к тепловой денатурации.

14.4.2.2. Фруктозо-1,6-дифосфатаза

Поскольку фосфофруктокиназная реакция сопровождается изменением свободной энергии, $\Delta G^\circ = -4\,500$ кал/моль, ее обращение

должно было бы потребовать введения не менее чем +4 500 кал/моль; этот процесс поэтому практически необратим. Отсюда следует вывод, что это и есть пусковая стадия гликолиза. Бывают, однако, обстоятельства, при которых полное обращение гликолиза, т. е. обратное превращение лактата в глюкозу, приобретает особое значение в метаболизме. Один из ферментов, который создает такую возможность, — это *фруктозо-1,6-дифосфатаза*, катализирующая реакцию



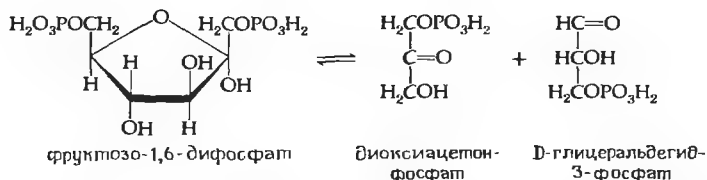
Фермент (мол. масса 130 000) представляет собой тетрамер, построенный из четырех неидентичных субъединиц. Фруктозодифосфатаза находится в цитозоле, и очевидно, что ее конкуренция с присутствующей там фосфофруктокиназой могла бы приводить к непрерывному бесполезному циклу. Однако возможность возникновения такого рода цикла предотвращается благодаря тому, что контрольные механизмы для действия фруктозодифосфатазы как раз обратны тем, которые регулируют активность фосфофруктокиназы. В присутствии одних лишь субстратов фосфатаза полностью активна, и кинетика реакции описывается гиперболической кривой. Связывание АТР или АДФ несколько снижает скорость реакции, но одновременно придает ей высокую чувствительность к АМР, который является аллостерическим ингибитором; таким образом, в присутствии АТР (как и при более высоких концентрациях АДФ) и при условии низкого уровня АМР зависимость скорости реакции от концентрации фруктозо-1,6-дифосфата описывается сигмоидной кривой и реакция идет при той заниженной $V_{\max}$, которая устанавливается при максимальном связывании АТР.

При экспериментальном диабете, вызванном стероидами коры надпочечников или аллоксаном (разд. 7.1.1), действие печеночных лизосомальных протеаз приводит к отделению от каждой субъединицы небольшого фрагмента, содержащего единственный остаток триптофана. Получающийся в результате фермент обладает повышенной чувствительностью к своим аллостерическим эффекторам.

14.4.2.3. Альдолазная реакция

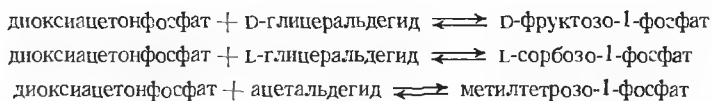
Фермент *альдолаза* катализирует обратимое расщепление фруктозо-1,6-дифосфата между С-3 и С-4 с образованием диоксиацетонфосфата и фосфатного эфира изомерной альдотриозы (глицеральдегида). Равновесие сильно сдвинуто в направлении обратной

реакции, т. е. образования фруктозодифосфата из двух триозофосфатов (табл. 14.1).



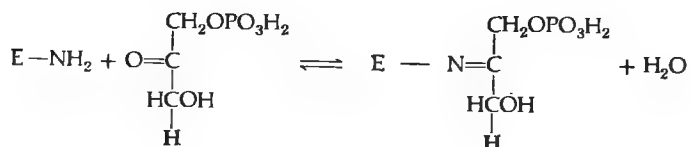
Альдолазы были получены из многих источников. Согласно имеющимся для ряда изученных препаратов данным, фермент представляет собой тетрамер (мол. масса 160 000). Животные ткани содержат по меньшей мере три различные альдолазы, характерные для мышц, печени и мозга соответственно. Все альдолазы расщепляют фруктозо-1,6-дифосфат до диоксиацетонфосфата и 3-фосфоглицеринового альдегида и могут катализировать обратную конденсацию диоксиацетонфосфата с различными оксальдегидами, хотя и с неодинаковой скоростью. Мышечный фермент, появляющийся в печени на ранних стадиях жизни, в дальнейшем заменяется. Полагают, что в метаболическом отношении это имеет значение только в том смысле, что мышечный фермент расщепляет фруктозо-1-фосфат довольно медленно, в то время как фермент печени расщепляет его столь же быстро, как дифосфат. Сохранение эмбрионального фермента печени (мышечная форма) у взрослого организма обусловлено генетическим дефектом, который ограничивает метаболизм принимаемой с пищей фруктозы у страдающих этим дефектом людей.

Для мышечного фермента продемонстрированы следующие реакции:



Все гидроксидные группы у атомов углерода новообразованной связи находятся в *транс*-положении относительно друг друга. Фермент проявляет абсолютную специфичность к диоксиацетонфосфатному компоненту этих реакций. Если мышечный фермент инкубировать с указанным субстратом в отсутствие какого-либо альдегида, то удастся наблюдать, что один из двух водородных атомов при том атоме углерода, который не этерифицирован с фосфатом, лабилизуется и обменивается с протонами среды. При восстановлении этой смеси борогидридом диоксиацетонфосфат прочно связывается с аминогруппой лизинового остатка фермента, что указывает на образование кетимина. Полагают, что при этом ла-

билизуется специфически обмениваемый водород (на схеме выделен жирным шрифтом) у соседнего атома углерода, так что протон передается на какую-либо основную группу фермента; образующийся в итоге карб-анион затем атакует альдегидный углерод молекулы другого субстрата.

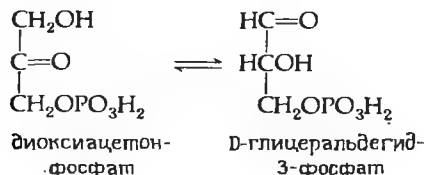


Подобно этому, фруктозо-1,6-дифосфат связывается с ферментом в форме кетона с незамкнутой цепью. Фуранозное кольцо α -аномера спонтанно открывается и закрывается 8 раз в секунду, в то время как кольцо β -аномера открывается и закрывается 35 раз в секунду. В стационарном состоянии имеется 81% β -формы, 15% α -формы, 1,5% *гем*-диола и 2% кетона, но количество последнего недостаточно для поддержания максимальной скорости ферментного процесса.

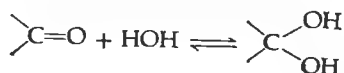
Мышечная альдолаза не нуждается в ионах металлов при иных кофакторах, в то время как фермент из дрожжей и многих бактерий активируется Fe^{2+} , Co^{2+} или Zn^{2+} и инактивируется связывающими металл реагентами. Zn^{2+} , очевидно, и есть тот катион, который содержится в нативном ферменте. Это позволяет рассматривать ион Zn^{2+} как льюисовскую кислоту, благодаря взаимодействию которой с кислородом кетогруппы субстрата облегчается ферментативная реакция, подобно тому как это происходит за счет ϵ -аминогруппы лизинового остатка у мышечного фермента.

14.4.2.4. Триозофосфатизомераза

Диоксиацетонфосфат и D-глицеральдегид-3-фосфат также родственны по структуре, как фруктозо- и глюкозо-6-фосфаты; подобно гексозофосфатам, триозофосфаты тоже могут взаимопревращаться; эта реакция катализируется триозофосфатизомеразой.



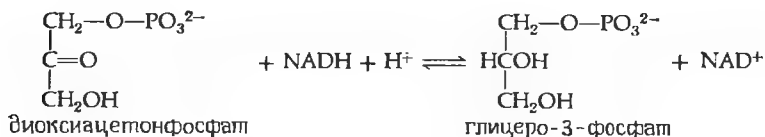
Фермент (мол. масса 56 000) представляет собой димер из двух неидентичных субъединиц. Раствор диоксиацетонфосфата содержит смесь приблизительно равных количеств *гем*-диольной формы и кетоформы.



Очевидно, что все три фермента, для которых диоксиацетонфосфат служит субстратом (альдолаза, триозофосфатизомеразы и глицерол-3-фосфат—дегидрогеназа) специфичны к кетоформе.

14.4.2.5. Восстановление диоксиацетонфосфата в глицерофосфат

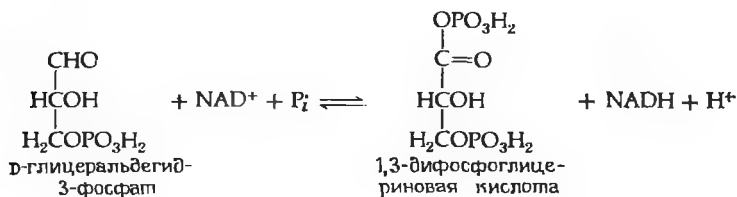
В то время как диоксиацетонфосфат направляется в главное «русло» гликолиза под действием изомеразы, диоксиацетонфосфат может иметь и другое метаболическое назначение, которое существенно для метаболизма липидов, а именно участие в синтезе глицерофосфата. Это осуществляется под действием *глицерол-3-фосфат—дегидрогеназы*.



Фермент (мол. масса 62 000) изучен лишь ограниченно. Он, по-видимому, имеет один аллостерический центр для каждого из четырех субстратов в дополнение к каталитическому центру. Связывание NADH способствует связыванию диоксиацетонфосфата, причем уменьшается сродство к глицерофосфату; NAD⁺ оказывает противоположное действие. У цыплят мышечный и печеночный ферменты совершенно различны. Каждый построен из двух идентичных субъединиц, но субъединицы печеночного и мышечного ферментов различаются. Фермент печени обладает значительно более низкой K_m для каждого из субстратов. В мышечной клетке катализируемая глицерол-3-фосфат—дегидрогеназой реакция, по-видимому, используется в качестве удачного приспособления для переноса NADH из цитоплазмы в митохондрию (гл. 12); сравнительно низкие значения K_m для фермента из печени позволяют предположить, что здесь основная роль фермента состоит в генерации глицерина для синтеза липидов.

14.4.2.6. Окисление глицеральдегид-3-фосфата

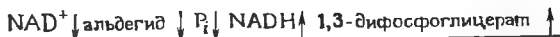
Участь триозофосфатов в метаболизме определяется главным образом глицеральдегид-3-фосфатом, который окисляется *глицеральдегидфосфатдегидрогеназой* до карбоновой кислоты. Для этой реакции необходим P_i , и покидающий фермент продукт — 1,3-дифосфоглицериновая кислота — представляет собой смешанный ангидрид фосфорной кислоты и карбонильной группы 3-фосфоглицериновой кислоты.



Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа получена в очищенной форме из многих источников; ферменты из мышцы кролика и дрожжей легко получать, поскольку они составляют 10 и 20% всех растворимых белков клеток соответственно. Действительно, в этих клетках молярные концентрации фермента сравнимы с концентрациями таких субстратов, как фруктозо-6-фосфат и триозофосфаты, и превосходят концентрации фруктозодифосфата или фосфоенолпирувата. Ферменты мышцы кролика и дрожжей (мол. масса 146 000) представляют собой тетрамеры из четырех одинаковых субъединиц, каждая из которых независимо участвует в катализе; изучена аминокислотная последовательность в молекуле фермента. Ферменты из мышцы кролика и дрожжей могут быть гибридизованы, но не в присутствии NAD^+ , укрепляющего связь тетрамеров.

Изолированный фермент уже содержит NAD^+ , относительно прочно связанный в соответствующих каталитических центрах. Свободный от NAD^+ фермент легко доступен перевариванию протеазами. Если на каждый тетрамер связывается две молекулы NAD^+ , то получается весьма устойчивый комплекс. Поэтому можно считать, что, хотя субъединицы идентичны, молекула должна рассматриваться как $\alpha_1\alpha_1 - \alpha_2\alpha_2$. Каждый димер имеет один центр для быстрого и один для более медленного связывания NAD^+ ; конформация NAD^+ -заряженного тетрамера, очевидно, должна существенно отличаться от незаряженной формы. Спектр поглощения связанного с NAD^+ фермента отличается от такового для большинства NAD^+ -зависимых дегидрогеназ, больше напоминая обычный комплекс фермент- NADH ; причина этого продолжает оставаться неизвестной. Кинетические исследования указывают на

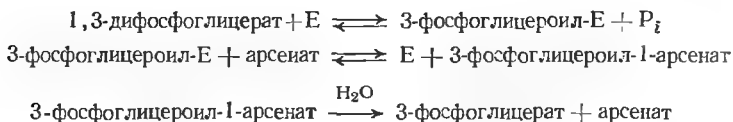
существование обязательного порядка в связывании с ферментом субстратов и отделении от него продуктов реакции:



Фермент исключительно чувствителен к ICH_2COOH — мощному ингибитору гликолиза. Он специфично алкилирует SH-группу цистеина-149, несмотря на присутствие еще трех других сульфгидрильных групп. О значении SH-группы цистеина-149 для функционирования фермента свидетельствует и тот факт, что в результате обработки фермента 1,3-дифосфоглицератом в отсутствие NADH образуется 3-фосфоглицероилтиоэфир цистеина-149. Затем ацильная группа медленно переносится на имидазольный азот гистидина-38 и в свою очередь на ϵ -аминогруппу лизина-183. Очевидно, что цистеин-149, гистидин-38 и лизин-183 располагаются в непосредственной близости от активного центра. Фермент может также функционировать как простая эстераза, и проявление этой активности предотвращается алкилированием сульфгидрильной группы и реагентами, затрагивающими имидазольную группу.

На основании этих и других наблюдений предполагают, что каталитический цикл глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы осуществляется следующим образом. Пиридиновое кольцо NAD^+ располагается вблизи активной —SH-группы, которая в результате стерически маскируется. Присоединение субстрата сопровождается возникновением тиополуацетальной связи между альдегидной группой и цистеином. NAD^+ затем восстанавливается, и тиополуацеталь окисляется до тиоэфира с образованием ацил-фермента. Таким путем карбонильная группа субстрата окисляется до карбоксильной. Вслед за этим NADH покидает фермент и заменяется на NAD^+ . Наконец, имидазольная группа катализирует фосфорилиз ацил-тиоэфира, производя перенос ацильной группы от фермента на P_i ; в результате образуется 1,3-дифосфоглицериновая кислота.

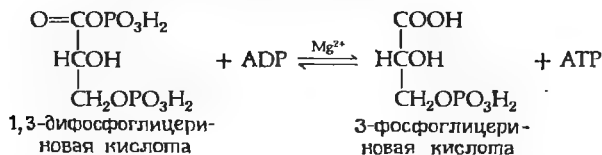
Если вместо P_i фермент использует арсенат, то продуктом окисления является просто 3-фосфоглицерат; механизм этого процесса был изучен путем инкубации фермента с 1,3-дифосфоглицератом и арсенатом. На основании полученных данных предложена приведенная ниже последовательность реакций:



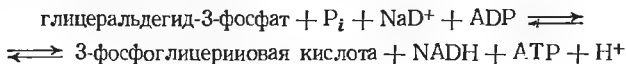
Протекание процесса в указанном направлении определяется нестойкостью молекулы 3-фосфоглицерил-1-арсената.

14.4.2.7. Фосфоглицераткиназа

1,3-Дифосфоглицериновая кислота представляет собой ангидрид кислоты, энергия для образования которого поставляется процессом окисления 3-фосфоглицеринового альдегида. Энергия, обычно освобождаемая при окислении какого-либо альдегида в карбоновую кислоту, удерживается в форме энергии химической связи, минуя тепловую форму энергии. Действительно, ΔG° для простого гидролиза 1,3-дифосфоглицерата, составляющая приблизительно —14 000 кал/моль, более чем достаточна для того, чтобы стал возможным перенос фосфата из 1-го положения 1,3-дифосфоглицерата к ADP. Реакция, катализируемая фосфоглицераткиназой (мол. масса 50 000), имеет следующий вид:



Ферменты мышц и эритроцитов различаются между собой. При редком наследственном заболевании, наблюдаемом на о. Самоа, генетическое замещение аспарагином остатка треонина в полипептидной цепи киназы эритроцита человека приводит к дефекту переноса фосфата и связанной с этим гемолитической анемии. Суммарный процесс, катализируемый глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой и 3-фосфоглицераткиназой соответственно, запишется следующим образом:

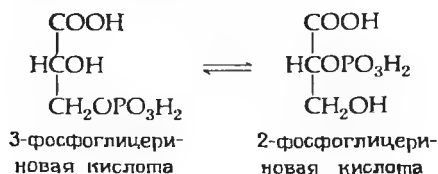


Положение равновесия сопряженной реакции сильно сдвинуто вправо. На самом деле именно изменение свободной энергии в этой реакции «толкает» в других случаях невыгодные альдолазную и триозоизомеразную реакции. При окислении триозофосфата до фосфоглицерата генерируется эквивалентное количество АТР. Это наиболее известный пример сопряжения экзергонического окисления метаболита с запасанием полезной химической энергии в форме энергии пирофосфатной связи АТР. Поскольку из каждой молекулы глюкозы образуются два триозных фрагмента, каждый из которых указанным способом превращается в 3-фосфоглицерат,

то, стало быть, на одну молекулу глюкозы генерируются две молекулы АТФ.

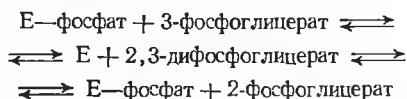
14.4.2.8. Фосфоглицеромутаза

3-Фосфоглицериновая кислота, которая возникает в результате описанной выше последовательности реакций, превращается в 2-фосфоглицериновую кислоту под действием *фосфоглицеромутазы* — димерного белка (молекулярная масса $\sim 65\,000$).



По крайней мере два изофермента встречаются у млекопитающих: во взрослой мышце — высокочувствительный к Hg^{2+} и в эмбриональной мышце не обладающий такой чувствительностью. В сердце и костной ткани взрослых организмов находится смесь этой пары ферментов.

Если процесс катализируется ферментом из эритроцитов, в качестве промежуточного продукта образуется 2,3-дифосфоглицерат. На основании аналогии с более подробно изученной фосфоглюкомутазной реакцией (разд. 15.3.3), а также исходя из факта установления быстрого равновесия при распределении ^{32}P между всеми участниками реакции для фосфоглицеромутазы из эритроцитов был предложен следующий механизм действия:



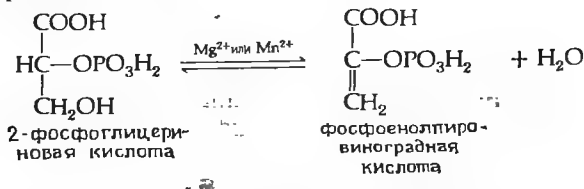
Приведенный механизм реакции согласуется с фактом содержания в изолированном белке 2 молей связанного 2,3-дифосфоглицерата на 1 моль фермента.

Роль 2,3-дифосфоглицерата в регулировании свойств гемоглобина обсуждается в гл. 31. Только в эритроцитах концентрация 2,3-дифосфоглицерата больше той, которая требуется для участия этого соединения в качестве субстрата в процессе гликолиза. Растения содержат фосфоглицеромутазу с иным механизмом действия.

14.4.2.9. Енолаза

2-Фосфоглицериновая кислота подвергается дегидратации в присутствии *енолазы* с образованием фосфорнокислого эфира ено-

ла пировиноградной кислоты.

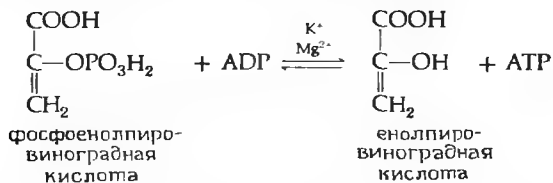


Енолаза (мол. масса 88 000) представляет собой димер из двух идентичных субъединиц. Однако у ряда видов обнаружены электрофоретически различимые изоферменты. Даже в отсутствие субстрата кофактор (Mg^{2+} или Mn^{2+}) прочно связывается с ферментом, который при этом подвергается значительному изменению конформации. Ион металла участвует в связывании субстрата с ферментом и, вероятно, в последующих электронных перестройках. Добавление фторида к активно гликолизующей системе останавливает енолазную реакцию и приводит к накоплению фосфоглицериновых кислот, возможно, благодаря образованию фторфосфата магния, который связывается с ферментом.

Положение равновесия в енолазной реакции находится около 0,5. Поэтому реакция практически не сопровождается существенным изменением свободной энергии. Однако следует иметь в виду, что фосфат в молекуле 2-фосфоглицерата образует сложноэфирную связь со вторичной спиртовой группой, а в результате енолазной реакции происходит образование фосфатного эфира енольного таутомера пировата. При pH 7 равновесие сильно сдвинуто в сторону кетоформы, и изменение свободной энергии, сопряженное с гидролизом фосфорного эфира этого енола, необычайно велико; $\Delta G^\circ \approx -12\,000$ кал/моль, т. е. вполне достаточна, чтобы разрешить перенос остатка фосфорной кислоты на ADP.

14.4.2.10. Пироваткиназа

Перенос фосфата от фосфоенолпировата к ADP катализируется *пироваткиназой* (мол. масса 240 000), которая, как предполагают, состоит из четырех идентичных субъединиц.



Для действия этого фермента абсолютно необходим Mg^{2+} ; фермент подавляется Ca^{2+} и функционирует только в присутствии до-

вольно высоких $[K^+]$. Зависимость от K^+ особенно выражена для обратной реакции, которая даже при $V_{\max}$ проходит только со скоростью 0,2% скорости прямого процесса. Необычная потребность в K^+ , согласно предположениям, объясняется необходимостью в иммобилизации карбоксильной группы фосфоенолпирувата. Последняя образует стабильный тройной комплекс с ферментом и Mg^{2+} , но сродство фермента к субстрату в 10 раз возрастает при добавлении K^+ .

Пируваткиназа является следующим после фосфофруктокиназы ферментом гликолиза, действие которого подчинено строгому регуляторному контролю. У млекопитающих известны две формы фермента, в печени (L-форма) и в мышце (M-форма), сильно отличающиеся по своему регуляторному поведению, которое в каждом случае соответствует метаболическим потребностям клетки, где функционирует фермент.

Кинетика катализируемой M-формой фермента реакции описывается гиперболической кривой. При высоких $[ATP]$ последний приобретает характер ингибитора; кинетика процесса описывается в этом случае кривой, близкой к сигмоидной, K_m для фосфоенолпирувата возрастает. Напротив, L-фермент в присутствии лишь своих субстратов Mg^{2+} и K^+ четко обнаруживает сигмоидные зависимости, которые становятся более выраженными под действием АТР и аланина. Эти явления могут быть полностью элиминированы путем увеличения $[фруктозо-1,6-дифосфата]$; кинетическая кривая представляет собой в этом случае уже гиперболу, и K_m для фосфоенолпирувата значительно снижается, что свидетельствует как о регуляции по принципу положительной прямой связи, так и о наличии кооперативного аллостерического центра, который должен быть заполнен одной молекулой субстрата, прежде чем каталитический центр сможет воздействовать на следующую молекулу. Это обстоятельство делает каталитическую активность необычной, зависимой от возрастания концентрации субстрата. Описанные закономерности иллюстрируются рис. 14.4.

Три дополнительных контрольных механизма регулируют печеночную пируваткиназу. При всех концентрациях субстратов и эффекторов она ингибируется как жирными кислотами с длинной цепью, так и ацетил-СоА; сукцинил-СоА является мощным ингибитором, но только в присутствии активирующих концентраций фруктозо-1,6-дифосфата. Поскольку эти отрицательные эффекторы конкурируют за одно и то же место на каждой субъединице, их эффекты аддитивны, а не кооперативны. Когда в клетку поступает достаточное количество этих материалов, они сами становятся предпочтительными субстратами окислительного метаболизма, компенсируя таким образом прекращение притока пирувата, которое обусловлено их ингибирующим эффектом на пируваткиназу.

Фермент из *E. coli* характеризуется чувствительностью к GTP.

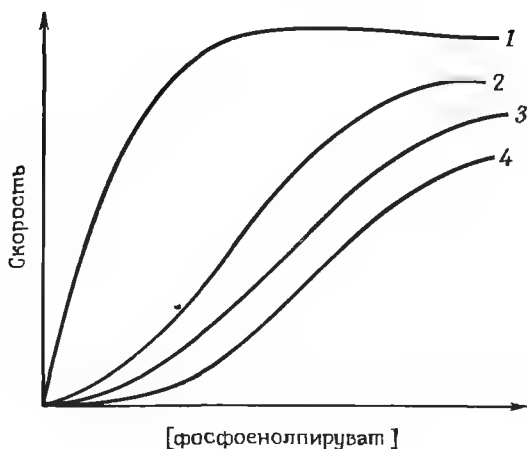


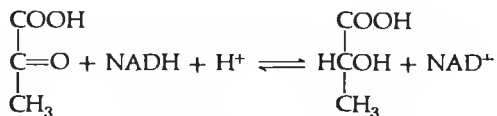
Рис. 14.4. Схематичное изображение механизма, контролирующего пируваткиназу. Для фермента из мышц: 1 — фермент с его нормальными субстратами; 2 — действие АТР при одной повышенной концентрации. Для фермента из печени: 1 — эффект фруктозодифосфата на систему в присутствии фермента и субстратов; 2 — фермент с его нормальным субстратом; 3 — эффект повышения концентраций АТР, 4 — эффект повышения концентрации и АТР, и аланина. Очевидно, что изменение концентрации одного из компонентов системы — фруктозидифосфата, и АТР и аланина — на фоне постоянных концентраций других компонентов приводит к показанным на рисунке изменениям.

В жировой ткани содержится L-фермент, в то время как фермент почек ведет себя так, как можно было ожидать от гибрида обеих форм, а именно обнаруживает кооперативность с фосфоенолпируватом (рис. 14.4, кривая 2), причем это явление не усиливается под действием АТР и не снимается фруктозодифосфатом. Фермент эмбриональной печени является М-формой; количество его быстро снижается после рождения, и он заменяется взрослой L-формой. Фермент дрожжей в общем напоминает L-форму.

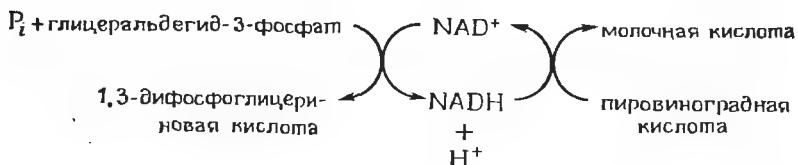
14.4.2.11. Образование молочной кислоты

Напомним, что превращение глицеральдегид-3-фосфата в 3-фосfogлицириновую кислоту достигается при восстановлении NAD^+ в NADH . В сравнении с обеспечением углеводами ресурсы NAD^+ в клетках сравнительно невелики, и поэтому если бы NADH , образуемый при окислении глицеральдегид-3-фосфата, не окислялся снова, анаэробный гликолиз должен был бы прекратиться с того момента, как весь NAD^+ был бы восстановлен в NADH . Это пред-

отвращается действием лактатдегидрогеназы, которая катализирует реакцию



Такое сопряженное взаимодействие между указанными двумя реакциями гликолитической последовательности может быть выражено следующим образом:



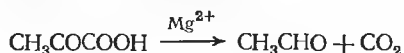
Положение равновесия лактатдегидрогеназной реакции, подобно таковому для всех реакций, включающих какую-либо оксикислоту и NAD^+ , сильно сдвинуто в сторону образования молочной кислоты, а не продуктов ее окисления. В связи с этим гликолиз протекает с накоплением двух молей лактата на один моль глюкозы. Лактат — это своеобразный тупик в метаболизме; однажды образовавшись, он не может превращаться иначе, как путем обращения лактатдегидрогеназной реакции и образования вновь пировиноградной кислоты в аэробных условиях. В противоположность фосфорилированным промежуточным продуктам гликолиза лактат и пируват не «заперты» в клетках, где они образуются. Поэтому *in vivo* лактат диффундирует из активно гликолизирующих мышечных клеток и переносится в печень с током крови (разд. 15.5.3).

Лактатдегидрогеназа представляет собой тетрамер из четырех субъединиц (молярная масса каждой 35 000). У животных электрофоретически различимы субъединицы двух типов. Они обозначаются как М и Н для скелетной мышцы и сердца соответственно; лактатдегидрогеназа мышцы в основном представляет собой M_4 , в то время как фермент сердца — главным образом H_4 . Однако все возможные гибриды M_3H_1 , M_2H_2 и M_1H_3 найдены в различных тканях. Свойства H_4 -фермента, который легко ингибируется пируватом, делают его особенно полезным для такого высокоаэробного органа, как сердце, где происходит и удаление лактата из кровотока, и его окисление до пирувата, который сразу подвергается

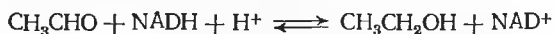
дальнейшим окислительным превращениям в митохондриях. Напротив, M_4 -фермент не подавляется пируватом и потому полезен для мышцы — органа, где происходят мощные всплески анаэробного гликолиза. Лактатдегидрогеназная мощность в мышце и печени превышает таковую для всех других ферментов гликолитической последовательности.

14.4.2.12. Спиртовое брожение

Последовательность реакций, приводящая к образованию пирувата в анаэробном метаболизме глюкозы у многих микроорганизмов, особенно у дрожжей, идентична с таковой у животных тканей. В отличие от обратимого синтеза лактата, описанного выше, у дрожжей пируват подвергается необратимому декарбоксилированию до ацетальдегида под действием *пируватдекарбоксилазы* (последняя отсутствует в тканях животных).



Молекула фермента (мол. масса 175 000) связывает четыре молекулы тиаминпирофосфата — необходимого кофактора для этой реакции. Как и при окислении пирувата (разд. 12.2.1), начальная стадия процесса заключается в образовании оксиэтилтиаминпирофосфата, однако в дальнейшем не происходит переноса оксиэтильной группы и комплекс распадается на свободный ацетальдегид с регенерацией кофермента. Образованный таким путем ацетальдегид восстанавливается NADH в реакции, которая катализируется *алкогольдегидрогеназой*.



Таким образом, в клетках дрожжей возникающий при окислении глицеральдегид-3-фосфата NADH служит для восстановления ацетальдегида, а не пирувата.

Если спиртовое брожение происходит в присутствии NaHSO_3 , последний связывается с ацетальдегидом, образуя продукт присоединения, недоступный для реакции с NADH. При этих условиях NADH используется глицерол-3-фосфат—дегидрогеназой для восстановления диоксиацетонфосфата (разд. 14.4.2.4). У анаэробных дрожжей при таких условиях образующийся глицерофосфат быстро гидролизует фосфатазой до глицерина и P_i .

14.4.3. Гликолиз и окисление пирувата; выход АТФ

В полном процессе превращения глюкозы в лактат не потребляется O_2 . Несмотря на то что процесс включает две окислительно-восстановительных реакции, а именно окисление глицеральдегид-3-фосфата до 1,3-дифосфоглицерата (путь 8, рис. 14.2) и вос-

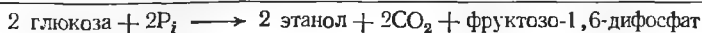
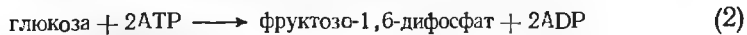
становление пирувата в лактат (путь 13), суммарного изменения степени окисления в результате гликолиза не происходит, что объясняется участием NAD^+ в перераспределении восстановительных эквивалентов.

Теперь можно рассчитать выход полезной энергии, получаемой при гликолизе, который начинается от глюкозы: при каждой киназной стадии фосфорилирования глюкозы и фруктозо-6-фосфата (пути 1 и 4) потребляется по 1 молю АТФ, 2 моля высокоэнергетического фосфата передаются на АДФ для регенерации АТФ в ходе реакции 9, когда 1,3-дифосфоглицерат превращается в 3-фосфоглицерат, и еще 2 моля АТФ генерируются при реакции 12, когда фосфоенолпируват отдает свой фосфат АДФ. Таким образом, на 1 моль глюкозы в процессе гликолиза с самого начала расходуются 2 моля АТФ, а в конце всего процесса образуются 4 моля АТФ, т. е. выход АТФ в результате составит 2 моля.

На основании этих рассуждений можно определить общую эффективность гликолиза. Около 48 000 кал/моль продуцируется, если расщепление глюкозы проходит только до лактата при стандартных условиях. Имеющаяся информация не позволяет рассчитать истинное изменение свободной энергии ΔG при физиологических условиях. Однако известно, что при гидролизе в физиологических условиях 2 моля АТФ до АДФ и P_i освобождается $\sim 24\,000$ кал, откуда следует, что при гликолизе 1 моля глюкозы около половины потенциально доступной энергии может быть запасено в виде химической энергии в АТФ.

В свете современных представлений о гликолизе интересно еще раз рассмотреть данные Гардена и Йонга (разд. 14.4). Обнаруженная в их опытах потребность в P_i при спиртовом брожении дрожжевых экстрактов, очевидно, отражает необходимость в P_i в глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназной реакции, единственной реакции в этой последовательности, в которой P_i действительно участвует. Отмеченный Гарденом и Йонгом факт накопления гексозодифосфата в ходе спиртового брожения, вызываемого бесклеточными экстрактами дрожжей, также получил объяснение. Напомним, что в клетках дрожжей, так же как в этих экстрактах, количество адениновых нуклеотидов мало в сравнении с количеством глюкозы. Когда весь присутствующий в экстракте АДФ превратился в АТФ, последовательность реакций должна остановиться на стадиях 1,3-дифосфоглицерата и фосфоенолпирувата. В принципе в живой клетке АТФ утилизируется в разнообразных эндогенных процессах, например при синтезе белка или мышечном сокращении, когда происходит регенерация как АДФ, так и P_i . В дрожжевом экстракте эти явления, однако, не имеют места. Единственное средство для утилизации АТФ представляет пара киназ, присутствующих в экстракте и совместно образующих из глюкозы фруктозо-1,6-дифосфат. Суммарный процесс брожения в этих

экстрактах, следовательно, может быть представлен как результат действия двух частных систем:



Накопленный фруктозодифосфат не подвергается дальнейшим превращениям, поскольку равновесие альдолазной реакции заметно сдвинуто в пользу фруктозодифосфата, а не смеси триозофосфатов. Причины отмеченной Гарденом и Йонгом потребности процесса брожения в NAD^+ и Mg^{2+} очевидны и не нуждаются в пояснениях. Соответствующую интерпретацию получило и наблюдение Гардена и Йонга об изменении характера брожения в присутствии арсената. В настоящее время известно (разд. 14.4.2), что глицеральдегидфосфатдегидрогеназа может переносить 3-фосфоглицероил на арсенат, образуя продукт, который спонтанно разлагается. При этих обстоятельствах на данной стадии процесса утрачивается необходимость в P_i , но и не может образовываться АТР. Поскольку в присутствии арсената на каждую сбраживаемую молекулу глюкозы могут генерироваться только две молекулы АТР (на стадии превращения фосфоенолпирувата в пируват), то очевидно, что это количество АТР лишь компенсирует его расход в более ранних киназных стадиях процесса; отсюда следует, что брожение или гликолиз может происходить в отсутствие P_i до тех пор, пока истощится вся глюкоза, причем эти процессы не сопровождаются накоплением фруктозодифосфата. Накопление фруктозодифосфата в живой клетке представляет собой совершенно бесцельный процесс, так как, даже если при этом и происходит превращение глюкозы в лактат (или этанол + CO_2), в результате не продуцируется АТР. Понимание этого обстоятельства способствует правильной интерпретации процесса гликолиза.

14.4.3.1. Окисление пировиноградной кислоты

Подобно глюкозо-6-фосфату, пировиноградная кислота занимает центральное положение в метаболизме, поскольку она участвует в нескольких метаболических реакциях, как это показано на рис. 14.5. Пируват может подвергаться обратимому восстановлению до лактата (см. выше), превращаясь обратно в глюкозу (разд. 14.6.1), использоваться для образования оксалоацетата или малата (разд. 14.6.1) или трансминироваться с образованием аланина (также обратимый процесс) гл. 20). Однако главная участь пирувата в большинстве клеток млекопитающих заключает-

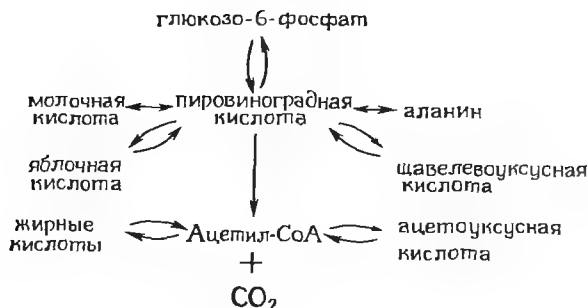
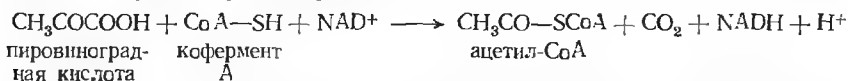


Рис. 14.5. Превращения пировиноградной кислоты у млекопитающих.

ся в его окислении до CO_2 и ацетил-S-CoA, как это описано в разд. 12.2.1. и кратко рассматривается еще раз ниже.

14.4.3.2. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты

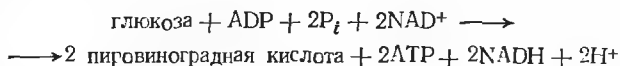
Окислительное декарбоксилирование пирувата до ацетил-S-CoA и CO_2 , по существу, необратимо.



Образуемый таким путем ацетил-S-CoA может быть использован в ряде реакций, таких, как ацетилирование холина или ароматических аминов или в биогенезе ацетоацетата, жирных кислот с длинной цепью и стероидов.

Наш интерес в этом вопросе, однако, сводится к биосинтезу АТФ (в физиологических условиях) при полном окислении глюкозы в результате полного окисления пирувата, продуцируемого в гликолитическом пути.

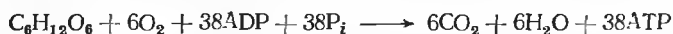
Ход событий в цитоплазме может быть представлен суммарным уравнением



Пируват затем поступает в митохондрии, где он превращается в ацетил-S-CoA и CO_2 ; это сопровождается генерацией NADH, окисление которого обеспечивает образование 6 молей АТФ на глюкозный эквивалент. При дальнейшем полном окислении ацетил-S-CoA образуется 12 молей АТФ, т. е. еще 24 молей АТФ на глюкозный эквивалент. Остается оценить вклад NADH, возникшего в цитоплазме при окислении глицеральдегид-3-фосфата. Как

указано ранее (разд. 12.2.2), цитоплазматический NADH должен восстановить некоторые метаболиты-переносчики, а именно ацетат или диоксиацетонфосфат, восстановленная форма которых может проникать через митохондриальный барьер и окисляться соответствующей митохондриальной дегидрогеназой. В зависимости от природы переносчика 2 моля окисляемого таким путем NADH могут давать 4 или 6 молей АТФ.

Как следует из суммарного процесса, представленного в табл. 14.2, теоретический общий выход АТФ составляет 38 молей на 1 моль окисленной глюкозы.



Подобный расчет эффективности этого процесса в лучшем случае может быть лишь грубо приближенным. В действительности

Таблица 14.2

Общий выход АТФ при превращениях глюкозы в дыхательной системе

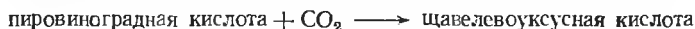
Последовательность реакций	Выход АТФ
Глюкоза $\longrightarrow$ фруктозо-1,6-дифосфат	—2
2 Триозофосфат $\longrightarrow$ 2,3-фосфоглицериновая кислота	+2
2NAD ⁺ $\longrightarrow$ 2NADH $\longrightarrow$ 2NAD ⁺	+6
2 Фосфоенолпировиноградная кислота $\longrightarrow$ 2пировиноградная кислота	+2
2 Пировиноградная кислота $\longrightarrow$ 2 ацетил-CoA + 2CO ₂	
2NAD ⁺ $\longrightarrow$ 2NADH $\longrightarrow$ + 2NAD ⁺	+6
2 Ацетил-CoA $\longrightarrow$ 4CO ₂	+24
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 \longrightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$	+38

процесс сопровождается существенной потерей свободной энергии. Полученная расчетная величина критическим образом зависит от свободной энергии образования АТФ при имеющихся в клетке условиях. Последние, а именно [АТФ], [АДП] и [Р_i], в свою очередь различаются в митохондриях и цитозоле. В стационарном состоянии отношение [АТФ]/[АДП] в клетке может увеличиваться от ~500 до 1000, что приводит к существенному возрастанию количества свободной энергии, требуемой для синтеза АТФ из АДП. Оценивая свободную энергию, которая могла бы быть освобождена в условиях клетки при простом гидролизе всего количества АДП, образовавшегося в результате окисления одного моля глюкозы, и учитывая при этом, что ΔG для гидролиза АТФ в физиоло-

гических условиях составляет приблизительно — 12 000 кал/моль, можно рассчитать, что $\sim 450\,000$ кал из потенциально доступных 686 000 кал действительно сохраняются при этом процессе. Эффективность процесса, таким образом, имеет порядок 65%.

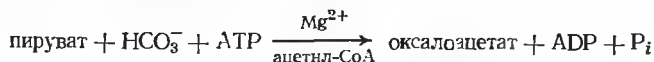
14.5. Анаплероз

Как показано на рис. 12.1, в результате каждого оборота цикла лимонной кислоты регенерируется один эквивалент щавелевоуксусной кислоты, необходимый для инициирования следующего оборота цикла. Очевидно, что, если какие-либо промежуточные продукты этого цикла были бы отведены в другие метаболические пути, цикл должен был бы остановиться, если только не возобновится поступление одного или нескольких требующихся веществ. Эта проблема отчетливо выражена в клетках растений и микроорганизмов, в которых α -кетоглутарат и оксалоацетат постоянно оттягиваются из цикла для синтеза глутаминовой и аспарагиновой кислот, которые в свою очередь являются предшественниками других аминокислот (гл. 20). Подобные соображения приложимы и к клеткам животных. Процессы, с помощью которых осуществляется восполнение недостающих промежуточных продуктов, носят название *анаплероз*. Первым указанием на существование анаплероза послужило наблюдение у гетеротрофных нефотосинтезирующих бактерий процесса, в основе которого оказалась следующая реакция:



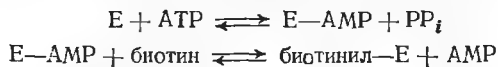
Вскоре после этого было установлено, что у животных, получавших $^{14}\text{CO}_2$, меченый углерод обнаруживается в гликогене печени. Хотя ни млекопитающие, ни гетеротрофные бактерии не способны к синтезу глюкозы из CO_2 , очевидно, что реакции фиксации CO_2 все же имеют место в нефотосинтезирующих биологических системах. К числу наиболее важных реакций такого типа относятся реакции, в которых участвуют пировиноградная и щавелевоуксусная кислоты.

Образование оксалоацетата. Главная анаплеротическая реакция в животных клетках и у многих растений и микроорганизмов катализируется *пируваткарбоксилазой*.



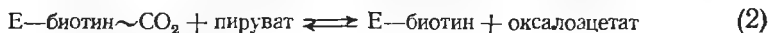
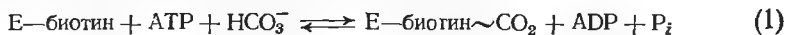
В животной клетке этот фермент (мол. масса 600 000) находится только в митохондриях; фермент состоит из четырех субъединиц, к каждой из которых пептидной связью, образуемой с ϵ -ами-

ногруппой остатка лизина, присоединена молекула биотина. Каждая субъединица содержит также один прочно связанный двухзарядный катион: Zn^{2+} — для фермента дрожжей, Mn^{2+} — для фермента печени крыс. Эти свойства присущи всем главным фиксирующим CO_2 ферментам животных клеток. Биотин присоединяется к уже сформированному холоферменту при участии особого фермента, катализирующего последовательность

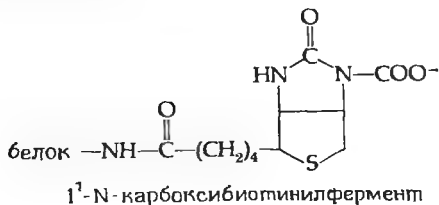


где в качестве промежуточного продукта, вероятно, образуется фосфоамид аденилата и специфического остатка лизина. Исключительно низкая $K_m^{\text{биотин}}$ (70 нмоль/л) находится в соответствии с ничтожными пищевыми потребностями в этом витамине.

Фиксация CO_2 происходит в две стадии:



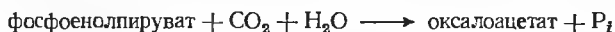
Структура соединения биотин— CO_2 такова:



ΔG° для гидролиза карбоксибиотинового комплекса составляет около -4700 кал/моль; в связи с этим данный комплекс может служить в качестве эффективного карбоксилирующего агента.

Наиболее характерной чертой пируваткарбоксилазы является абсолютная потребность в ацетил- CoA ; в отсутствие этого положительного эффектора фермент не способен катализировать фиксацию CO_2 на биотине. Если фиксация CO_2 на связанном с белком биотине протекает в отсутствие пирувата и фермент затем освобождается от ацетил- CoA , то последующий перенос CO_2 на пируват все еще может происходить. Однако роль пирувата в процессе синтеза оксалоацетата не ограничивается его участием в качестве субстрата реакции — пируват также ускоряет каталитический процесс в стадии карбоксилирования биотина. Фермент, возможно, обладает специфическими центрами связывания для CoA -производных жирных кислот с более длинной цепью, которые также выполняют роль положительных эффекторов. Аспартат — сильный отрицательный эффектор некоторых микробных пируваткарбоксилаз.

В растениях и микроорганизмах содержится *фосфоенолпируваткарбоксилаза*, катализирующая реакцию



Фермент из *E. coli* оказался тетрамером из субъединиц с мол. массой по 100 000 и характеризуется сигмоидной кривой для зависимости скорости реакции от концентрации фосфоенолпирувата. Однако в присутствии ацетил-СоА или фруктозоdifосфата эта зависимость изображается гиперболической (уменьшение $K_m^{\text{пируват}}$ и увеличение V_{max}). Этот фермент также заметно ингибируется аспаратом и стимулируется NADH. Вместе с тем другой фермент, *фосфоенолпируват-карбоксифосфотрансфераза*, присутствующий у *Propionibacterium* и *Entamoeba histolytica*, катализирует реакцию



Этот фермент также представляет собой тетрамер из субъединиц с мол. массой по 100 000.

14.5.1. Метаболизм промежуточных продуктов в цикле лимонной кислоты

14.5.1.1. Образование фосфоенолпирувата

Существуют обстоятельства, при которых промежуточные продукты цикла лимонной кислоты и другие соединения, способные превращаться в эти продукты, направляются на синтез глюкозы путем обращения гликолитической последовательности. Однако, как ранее указывалось (рис. 14.2 и разд. 14.4.2), этот процесс жестко лимитирован в связи с исключительно низкой скоростью обратной пируваткиназной реакции. Обходный путь, минуящий этот заблокированный участок, обеспечивается действием *фосфоенолпируваткарбоксикиназы* (мол. масса 75 000), которая катализирует реакцию

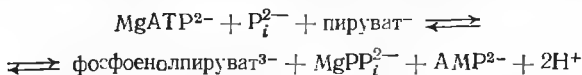


$K_m^{\text{оксалоацетат}}$ составляет ~ 2 мкмоль/л; $\Delta G^\circ = -4\,000$ кал/моль. Фосфоенолпируваткарбоксикиназа локализуется преимущественно в цитозоле, хотя небольшие количества фермента найдены и в митохондриях печени большинства видов животных. Только для печени кролика активности фермента в митохондриях и цитозоле сравнимы. Особые функции этих двух форм не известны, но это различные белки; митохондриальный фермент дает лишь слабую перекрестную реакцию с антителами к ферменту цитозоля. GTP для реакции должен поставляться митохондриями. Он может возникать либо при окислении α -кетоглутарата (гл. 12), либо под действием *нуклеозид-дифосфаткиназы* (гл. 12):

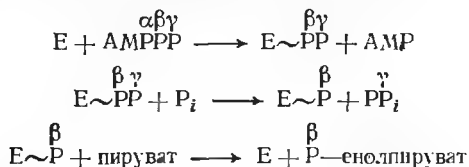


Мощность фермента, измеренная в клетках, производящих максимальное количество глюкозы, достаточна для обеспечения потребности этого процесса в GTP.

Тропические злаки, равно как и некоторые микроорганизмы (*Propionibacterium shermani* и амеба *Entamoeba histolytica*), приобрели способность к интересному другому решению этой проблемы, а именно у них имеется фермент *пируватогидрофосфат—дикиназа*, которая катализирует суммарную реакцию

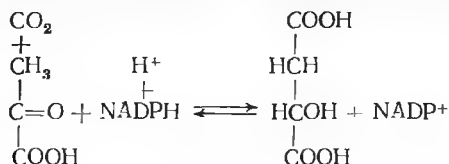


K_{eq} для реакции в том ее виде, как она записана, составляет 10^{-3} , что должно было бы оказаться неблагоприятным; но реакция в этом случае идет в нужном направлении благодаря забуфериванию двух протонов и становится необратимой, если PP_i гидролизует неорганической *пирофосфатазой* ($\text{PP}_i \xrightarrow{\text{H}_2\text{O}} 2\text{P}_i$). Механизм, по-видимому, таков (E — фермент):



14.5.1.2. Малик-фермент

Этому ферменту одно время придавали большое значение в фиксации CO_2 ; *малик-фермент* катализирует реакцию:



По способу своего функционирования он аналогичен изоцитратдегидрогеназе и подобно ей нуждается в Mn^{2+} . Однако, в связи с тем что малик-фермент действует как механизм для генерации NADPH, его роль в метаболизме, вероятно, обратна той, которую играет изоцитратдегидрогеназа. Малик-фермент найден в цитозоле клеток печени и жировой ткани, но присутствует также в митохондриях сердца, мозга и коры надпочечников. Митохондриальный фермент и фермент цитозоля — это различные белки. Ферменту митохондрий свойственна положительная кооперативность в отношении малата, т. е. сигмоидная кривая скорости реакции, в то время как для фермента цитозоля характерна гиперболическая кривая. Добавление к митохондриальному ферменту сукцината в той же концентрации, как в митохондриях, снимает кооперативность, что проявляется в смене сигмоидной кривой, характеризующей кинетику кооперативного процесса, гиперболой;

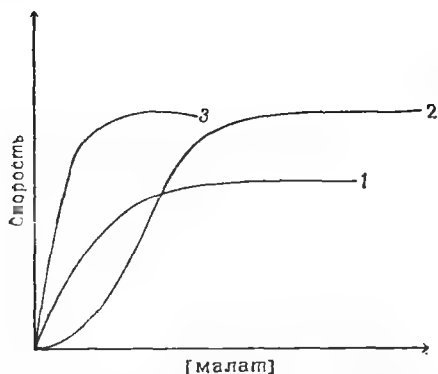


Рис. 14.6. Кинетика малик-фермента. 1 — фермент цитозоля; 2 — фермент митохондрий; 3 — фермент митохондрий в присутствии сукцината.

такой характер кривой объясняется, вероятно, тем, что все места связывания эффикторов заполнены при этой концентрации сукцината так, что $V_{\max}$ достигается при очень низких значениях [малата] (рис. 14.6).

В митохондриях животных клеток имеется еще один фермент, синтезирующий малат, который утилизирует NAD^+ , а не NADP^+ . В отличие от малик-фермента этот фермент не способен декарбоксиллировать оксалоацетат при pH 5 в отсутствие пиридиннуклеотида. Роль этого фермента неизвестна.

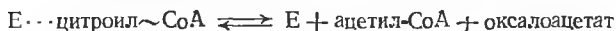
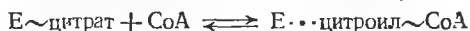
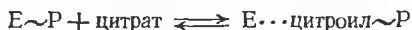
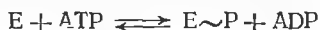
14.5.1.3. АТФ-цитрат-лиаза

В цитозоле клеток печени и жировой ткани *АТФ-цитрат-лиаза* тетрамер из идентичных субъединиц (мол. масса 110 000) катализирует реакцию



Практически одна молекула АТФ расходуется на молекулу цитрата для обращения результатов действия цитратсинтазы в митохондриях. Начальная стадия процесса, по-видимому, заключается в реакции АТФ с карбоксильной группой фермента с образованием ферм $\sim \text{P}$. В экспериментальных условиях реакция может происходить в отсутствие АТФ, если субстратом служат цитрилфосфат или цитрил-CoA.

На основании вышеизложенного сложная реакция, катализируемая АТФ-цитрат-лиазой, может быть представлена в виде нескольких последовательных стадий (E = фермент):



Хотя эта реакция и снабжает цитозоль оксалоацетатом, ее основная функция заключается в генерации ацетил-СоА для синтеза жирных кислот (разд. 14.6.1).

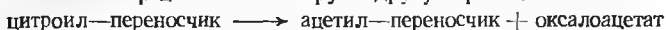
У многих бактерий имеется фермент цитрат-лиаза, который катализирует суммарную реакцию



Наиболее изучен фермент из *Klebsiella pneumoniae*. Это гексамер, построенный из трех различных субъединиц (α, β, γ). γ -Цепь (мол. масса 11 000) ковалентно соединена с дефосфо-СоА эфирной связью между гидроксилом серина и 5'-фосфатом адениловой части молекулы кофермента; между сульфгидрильной группой дефосфо-СоА и ацетатом возникает тиоэфирная связь (установлено при изучении изолированного фермента). Отсюда следует, что γ -цепь относится к ацил-переносящим белкам (разд. 17.6.1). α -Цепь катализирует реакцию



а β -цепь катализирует другую реакцию:

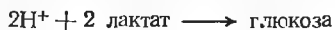


Таким образом, цитрат-лиаза напоминает различные биотинсодержащие ферменты, включающие также один белок-переносчик, который служит субстратом для последующих реакций, катализируемых парой прочно связанных ферментов, а именно ацетил-СоА—карбоксилазой (разд. 17.6.1) и метилмалонил-СоА—карбоксилтрансферазой (разд. 14.9.3).

14.6. Глюконеогенез

14.6.1. Путь образования глюкозы из молочной кислоты

Впервые предположение об обратимости гликолиза было высказано в связи с наблюдением, что молочная кислота, образовавшаяся из гликогена при сокращении изолированной мышцы в анаэробных условиях, медленно исчезает после введения кислорода; при этом около одной пятой окисляется до CO_2 , в то время остальная часть превращается в гликоген. Условия для обращения гликолиза, а именно для синтеза одной молекулы глюкозы из двух молекул молочной кислоты:



могут быть легко охарактеризованы. Поскольку для всего процесса при стандартных условиях $\Delta G^\circ = +48\,000$ кал/моль и поскольку для того, чтобы процесс осуществлялся в действительности, должно затрачиваться еще большее количество энергии, превышающее 48 000 кал/моль, с тем, чтобы процесс в целом проходил с потерей свободной энергии, простое обращение прямых реакций гликолиза, описанное выше, не могло бы быть достаточным. Какие-то альтернативные пути должны, следовательно, функционировать, обеспечивая поступление необходимой энергии. Напомним, что *пируваткиназа* катализирует свою реакцию в обратном на-

правлении настолько медленно, что как по кинетическим, так и по термодинамическим соображениям после образования пирувата путем обращения лактатдегидрогеназной реакции требуется иной путь для того, чтобы из пирувата мог образоваться фосфоенолпируват. При рассмотрении последовательности реакций, ведущей к фосфоенолпирувату в гликолизе (рис. 14.2, последовательные реакции 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 3, 2), становится очевидным, что, как только этот продукт возник, положения равновесий дальнейших альдолазной, фруктозо-1,6-дифосфатазной и глюкозо-6-фосфатазной реакций могут обеспечить «продвижение» фосфоенолпирувата по обратной реакции к глюкозе, если с двух фосфатаз снимаются контроли.

Реакции, приводящие к синтезу фосфоенолпирувата, катализируются пируваткарбоксилазой и пируваткарбоксикиназой и последовательно изображаются с помощью уравнений



Поскольку превращение лактата в глюкозу происходит только в аэробном органе, где поступление O_2 не является лимитирующим фактором, снабжение процесса АТФ и GTP обеспечено.

Имеется, однако, некоторое усложняющее обстоятельство, связанное с характером проницаемости митохондрий. Щавелевоуксусная кислота, которая образуется в митохондриях, не может, как таковая, легко покинуть ее, что необходимо для взаимодействия с находящейся в цитозоле пируваткарбоксикиназой. Эта проблема еще не получила окончательного решения, хотя легко может быть предложено несколько способов. Так, представляется весьма вероятным, что образовавшийся в митохондриях оксалоацетат входит в цитозоль в виде смеси малата и аспартата. На рис. 14.7 показаны маневры, при помощи которых клетка преодолевает затруднения, связанные с тем, что пируваткарбоксилаза находится в митохондриях, а не в цитозоле. Изображенный механизм окисления цитоплазматического NADH в митохондриях и есть тот самый челночный механизм, с помощью которого, как предполагают, происходит передача восстановительных эквивалентов от NADH, образовавшегося при окислении глицеральдегид-3-фосфата в цитоплазме (разд. 14.2.2), к митохондриальной электронпередающей цепи в обычных аэробных условиях. Несколько иной цикл, включающий перенос аминогрупп (гл. 21) требуется, если аспартат, а не малат, служит той четырехуглеродной дикарбоновой кислотой, которая выходит из митохондрий.

Причина такого пространственного разделения участвующих в глюконеогенезе ферментов, которое наблюдается у ряда видов, оста-

цитозоль

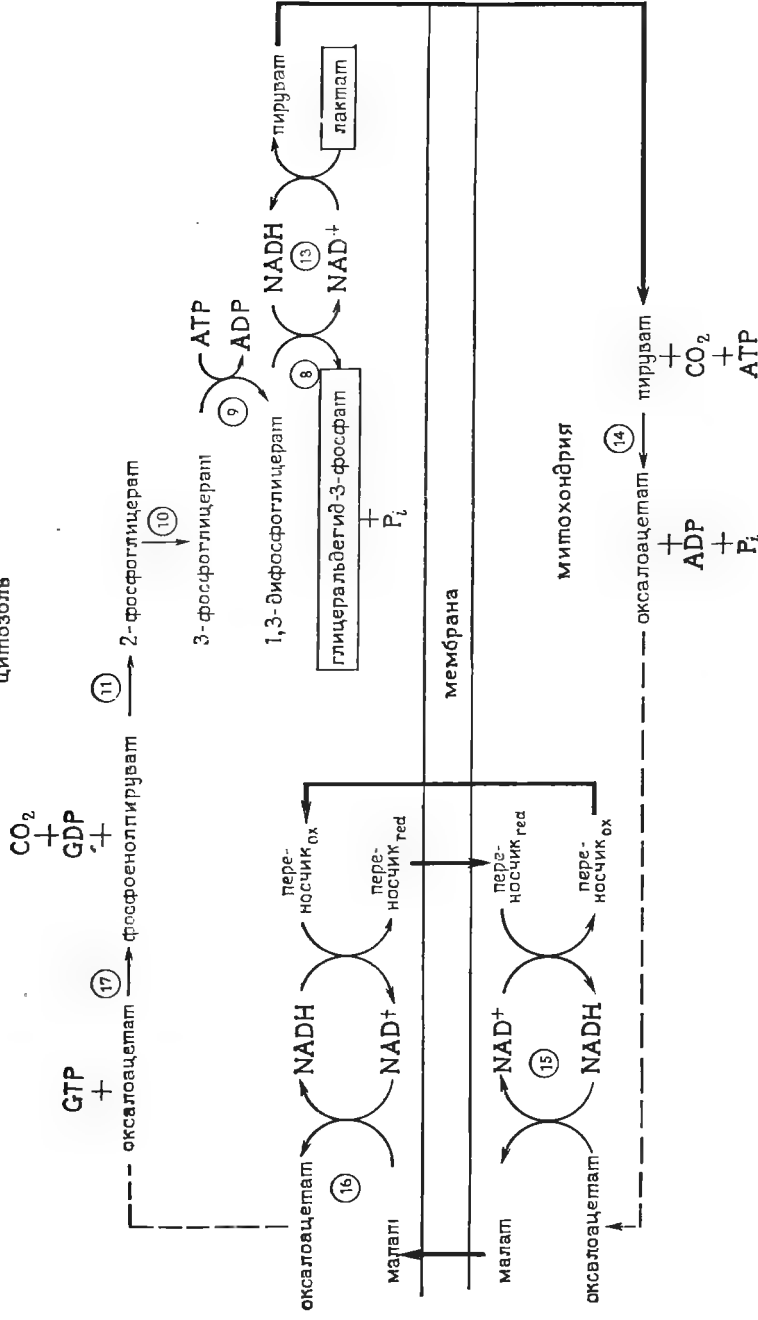
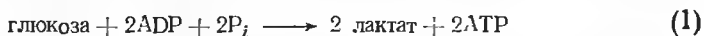


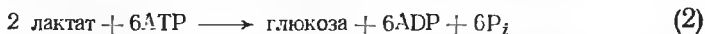
Рис. 14.7. Синтез глицеральдегид-3-фосфата из лактата в процессе глюконеогенеза. Числа в кружочках указывают фермент-участник в соответствии с рис. 14.2; дополнительные ферменты: 14—пируваткарбоксилаза, 15—малатдегидрогеназа (митохондриаль), 16—малатдегидрогеназа (цитозоль), 17—пируваткарбоксикиназа. Входящие продукты представлены лактатом, 2 АТР, GTP, на этой стадии образуются глицеральдегид-3-фосфат, 2 АТР, GDP и P_i. Переносчик (не названный) представляет окислительно-восстановительную пару, оба компонента которой способны пересекать митохондриальную мембрану (в отличие от пары малат/оксалоацетат) и для которых имеются соответствующие дегидрогеназы на обеих сторонах. Митохондриальная переносящая дегидрогеназа показана как NAD-зависимая, но это не обязательно и даже до известной степени маловероятно. В качестве переносчика-восстановителя могли бы выступать β-оксипируват и глицерол-3-фосфат. Как показано, окисление лактата протекает сопряженно с восстановлением 1,3-дифосфоглицерата, причем та же пара оперирует и при прямом направлении гликолиза.

ся неясной. Известны виды животных, у которых отмечается значительный уровень активности пируваткарбоксикиназы в митохондриях; у таких животных, как, например, у кролика, пируват превращается в фосфоенолпируват в митохондриях и оттуда поступает в цитозоль.

Очевидно, что образование глюкозы из лактата не представляет собой простого обращения гликолиза. Пируваткиназа, фосфофруктокиназа и глюкокиназа не используются в этом процессе, в то время как пируваткарбоксилаза, фосфоенолпируваткарбоксикиназа, обе малатдегидрогеназы и две различные фосфатазы необходимы. Если суммарный процесс гликолиза может быть описан как



когда около одной трети потенциально доступной энергии сохраняется в форме АТФ, то обратный процесс описывается как



На каждую молекулу лактата требуется по одной молекуле АТФ в реакциях, катализируемых пируваткарбоксилазой, фосфоенолпируваткарбоксикиназой (в действительности в форме ИТР или GTP) и фосфоглицераткиназой. Поскольку, как отмечено выше, минимальная потребность в энергии для синтеза глюкозы из лактата составляет +48 000 кал/моль и поскольку требуется лишь шесть молекул АТФ для осуществления этого процесса, синтез глюкозы энергетически выгоден, несмотря на его сложность.

14.6.1.1. Начальная стадия синтеза жирных кислот из глюкозы

Как следует из общей схемы метаболизма углеводов (рис. 14.1), образующийся при окислении пирувата ацетил-СоА может утилизироваться в синтезе жирных кислот. Хотя синтез и окисление жирных кислот подробно рассматриваются в гл. 17, целесообразно отметить здесь, что начальная стадия этого процесса характеризуется того же рода проблемами, как и для синтеза фосфоенолпирувата. Дело в том, что пируватдегидрогеназа локализована в митохондриях, и образовавшийся при окислении пирувата ацетил-СоА не может достаточно легко проникать через митохондриальную мембрану в цитозоль.

Физиологическое решение этой проблемы в случае синтеза жирных кислот аналогично описанному ранее и заключается в трансформации ацетил-СоА в какую-либо экспортбельную форму, после чего наступает регенерация и возврат переносчика. Используемый механизм, по-видимому, включает обычный синтез цитрата, катализируемый цитрат-синтазой. Цитрат затем покидает митохондрию (рис. 14.8). Вход и выход ди- и трикарбоновых кислот

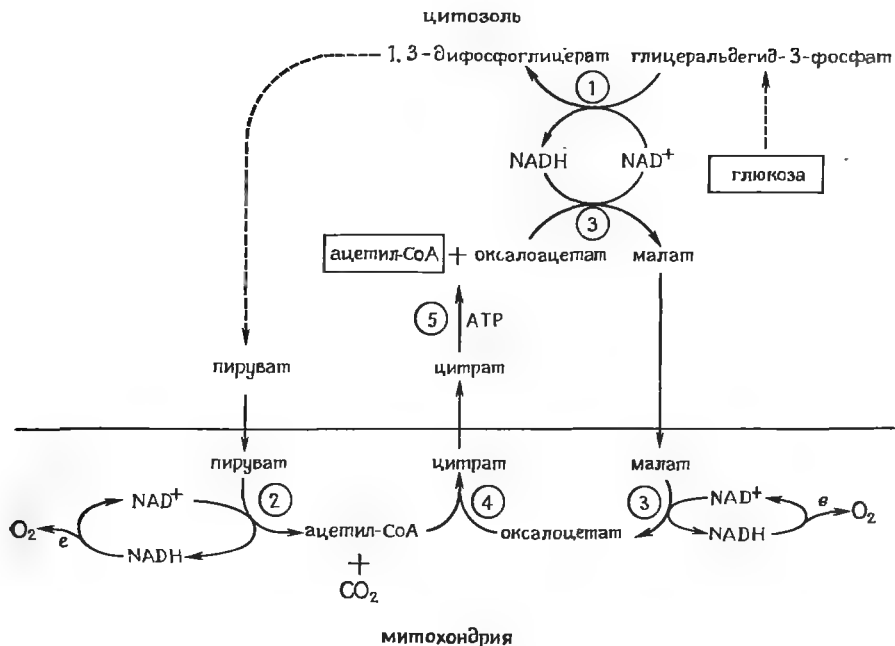


Рис. 14.8. Образование ацетил-СоА в цитозоле из глюкозы. Числа в кружочках указывают ферменты: 1 — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, 2 — пируватдегидрогеназа, 3 — малатдегидрогеназа, 4 — цитрат-синтаза и 5 — АТФ-цитрат-лиаза.

в митохондриях являются облегченными процессами, которые проходят на основе симпортных механизмов и включают обязательные обмены (например, малат внутри митохондрии на цитрат снаружи и малат снаружи на P_i внутри). В цитоплазме цитрат расщепляется до ацетил-СоА (при затрате 1 моля АТФ на моль цитрата) под действием АТФ-цитрат-лиазы (разд. 14.5.1). Ацетил-СоА тогда становится доступным для синтезирующей жирные кислоты системы эндоплазматической сети (разд. 17.6.1). Образовавшийся оксалоацетат, как указано ранее, не проникает через митохондриальную мембрану и должен сначала подвергнуться восстановлению до малата или трансаминированию в аспартат. Малат может проходить как таковой или окисляться до пирувата малик-ферментом (рис. 14.5.1); в митохондрии пируват может вновь карбоксилироваться пируваткарбоксилазой с образованием оксалоацетата для следующего оборота цикла. Затраты клетки на один цикл, в результате которого один ацетил-СоА поступает в цитозоль, сводятся к двум молекулам АТФ, которые расходуются в реакциях с участием пируваткарбоксилазы и цитрат-лиазы соответственно.

Образуемый при действии малик-фермента NADPH утилизируется в процессе синтеза жирных кислот; механизм, ответственный за экспорт из митохондрий в цитозоль восстановительных эквивалентов для малатдегидрогеназной реакции, недостаточно изучен.

Коротко остановимся на значении АТФ-цитрат-лиазы для синтеза жирных кислот у жвачных. Эмбрион жвачного животного образует жирные кислоты из материнской глюкозы и располагает большим количеством АТФ-цитрат-лиазы в печени; когда молодое жвачное животное начинает питаться продуктами рубцового метаболизма, главным образом жирными кислотами с короткой цепью, активность лиазы начинает понижаться и, наконец, практически исчезает спустя три недели после рождения.

14.7. Регуляция гликолиза и глюконеогенеза

Довольно многочисленные наблюдения показывают, что процессы гликолиза и глюконеогенеза осуществляются плавно, в соответствии с физиологическими потребностями. Так, мышца в состоянии покоя не выделяет лактат в кровяное русло, но и печень не окисляет притекающий лактат, несмотря на высокое содержание лактатдегидрогеназы. У взрослых людей, получающих рацион, богатый углеводами, избыточные углеводы запасаются сначала в форме печеночного и мышечного гликогена, а затем в виде нейтральных триацилглицеринов, которые образуются в печени и в жировой ткани. Однако при нагрузке гликолиз в мышце значительно усиливается; образующийся лактат удаляется печенью из тока крови, где он превращается в гликоген. В течение нескольких часов, считая от последнего приема пищи, печеночный гликоген используется для поставок в кровь глюкозы, единственного «топлива», приемлемого для мозга; печень перестает «гликолизировать», переключается на окисление жирных кислот для собственного обеспечения энергией и начинает превращать аминокислоту в глюкозу. Эти явления свидетельствуют о том, что скорости действия ферментных систем, совокупность которых составляет какой-либо путь, определяются не только количеством этих ферментов и их субстратов. Очевидно, именно поэтому не удалось получить доказательств существования в метаболизме ряда бесполезных циклов, которые можно было теоретически допустить на основании схемы метаболизма (рис. 14.1). В самом деле, полное сопряжение всех путей гликолиза и глюконеогенеза



должно было бы составить гигантский бесполезный цикл, результат которого выразился бы в гидролизе 4 молей АТФ за один оборот; в этом случае для повторного синтеза глюкозы должен был

бы утилизироваться тот АТР, который образуется при гликолизе. Однако, как известно, скорости протекания этих процессов в клетке в норме соответствуют потребности и сопровождаются относительно малыми потерями энергии.

Координация скоростей протекания гликолиза и глюконеогенеза в соответствии с физиологическими потребностями обеспечивается действием разнообразных контрольных механизмов, которые варьируют для каждого индивидуума в зависимости от времени, а также от органа к органу и от вида к виду.

1. В печени, как и везде в организме, наивысшая скорость гликолиза составляет не более 10% той скорости, которая могла бы установиться, если бы фермент, мощность которого лимитирует скорость процесса, а именно фосфофруктокиназа, действовал максимально. (Термин *мощность* применяется здесь в смысле характеристики числа молей субстрата, изменяющихся в минуту, т.е. позволяет связать концентрацию фермента и число его оборотов при существующих условиях.) Это не совсем так для обратного направления процесса; количество пируваткарбоксикиназы лишь ненамного превышает то, которое необходимо для поддержания наблюдаемых скоростей глюконеогенеза. Гликолиз постоянно происходит в печени, жировой ткани и почках. Однако скорость его *in vivo* составляет лишь очень малую долю скорости, наблюдаемой в экспериментальных условиях, когда эти ткани инкубируются анаэробно. В мышце скорость гликолиза лимитируется скоростью использования АТР для сокращения; гликолитическая мощность этого органа определяется мощностью фосфофруктокиназы, которая должна соответствовать таковой для фосфоорилазы гликогена (разд. 15.3.2) — фермента, ответственного за расщепление гликогена и поступление резервной глюкозы в эту систему.

2. Концентрации большинства метаболитов в тканях обычно соответствуют порядку значений K_m , измеренных в реакциях, где они участвуют. Единственное исключение, по-видимому, представляет пируваткарбоксикиназу; тканевая концентрация оксалоацетата составляет лишь около 10% наблюдаемой K_m , что позволяет предположить действие каких-то еще не выявленных активаторов.

3. Главные известные в настоящее время контрольные механизмы гликолиза в принципе проявляются на трех киназных стадиях: гексокиназной, фосфофруктокиназной и пируваткиназной. Примечательно, что все эти стадии являются необратимыми стадиями гликолиза; все они ограничены участием в гликолитическом пути и не играют роли в глюконеогенезе. Благодаря такой организации обратимые стадии могут свободно участвовать в глюконеогенезном пути.

4. Некоторые из выявленных главных специфических контрольных устройств гликолиза и глюконеогенеза суммированы на рис. 14.9; показана регуляция по принципу положительной прямой

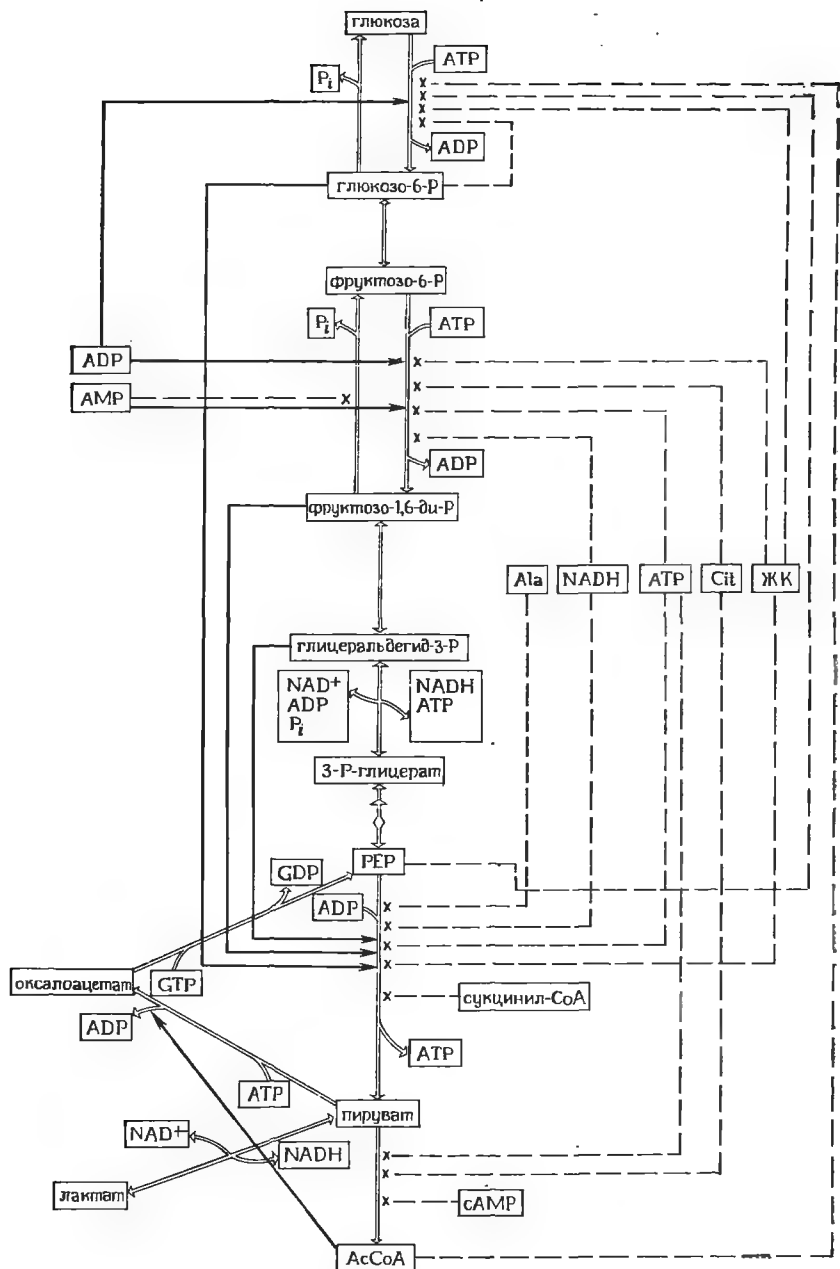


Рис. 14.9. Некоторые контрольные механизмы, оперирующие в гликолизе и глюконеогенезе. Полные стрелки обозначают пути реакций. Сплошными линиями (стрелки) показаны активаторы, штриховыми — ингибиторы, ЖК — жирные кислоты, Cit — цитрат, Ala — аланин, PEP — фосфоенолпируват; все другие сокращения либо очевидны сами собой, либо стандартны. (Взято с некоторыми изменениями из работы [Weber G., Adv. Enz. Regul., 7, 37, 1969].)

связи двумя метаболитами и рядом ингибиторов и-активаторов. Каждый фермент вполне чувствителен к изменениям в концентрации каждого ингибитора или эффектора в пределах их физиологической роли. Глюкозо-6-фосфатаза и фруктозо-дифосфатаза могут быть ингибированы вплоть до нескольких процентов их максимальной активности. Для функционирования пируваткиназы необходима активация положительными эффекторами; в пределах физиологических концентраций отрицательных эффекторов она может быть полностью подавлена. Пируватдегидрогеназа — единственный представитель в этой серии ферментов, который блокируется вследствие образования ковалентной связи с ингибитором (разд. 12.2.4). Контролирующие скорость процесса внутренние механизмы, присущие гликолитической системе, недостаточно изучены. Ясно, что итоговая скорость гликолиза должна определяться доступностью субстрата, утилизацией АТФ и концентрациями различных ферментов. У дрожжей определенно лимитирующими являются максимальная активность фосфофруктокиназы, пируваткиназы и альдолазы, которые составляют лишь 1—10% активностей енолазы, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы и фосfogлицераткиназы. В результате некоторые реакции протекают в близких к равновесным условиям, в то время как реакции, катализируемые гексокиназой, фосфофруктокиназой, глицеральдегидфосфатдегидрогеназой и пируваткиназой, далеки от своего равновесия в условиях стационарного состояния клетки. В действительности, будучи открытой системой, живая клетка, очевидно, не может достигать стационарного состояния, если при потоке веществ и энергии через эту систему истинная концентрация каждого промежуточного продукта сохраняется постоянной. В качестве примера на рис. 14.10 приведена запись концентрации NADH в бесклеточном дрожжевом экстракте. Такие колебания концентрации, продолжающиеся

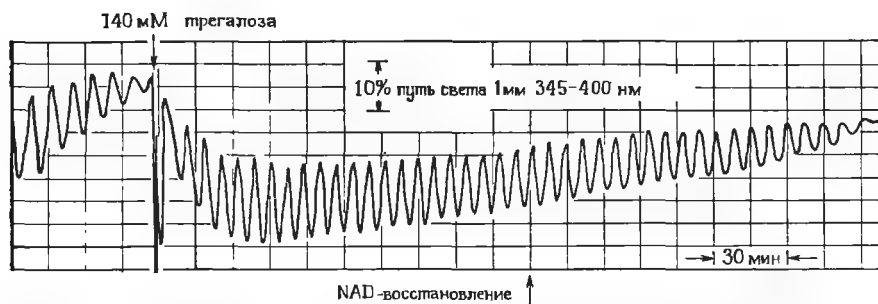


Рис. 14.10. Колебания NAD^+/NADH в бесклеточном экстракте дрожжей. Когда запас глюкозы приближался к истощению, в среду вводили трегалозу, которая может сбраживаться после гидролиза, и регистрировали концентрацию NADH по его поглощению. [Pye K., Chance B., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 55, 888, 1966.]

бесконечно, — в основном результат непрерывных изменений скорости фосфофруктокиназной реакции, так как меняются концентрации ее субстрата, продукта и эффектора. Изложенные представления существенным образом подтверждаются на примере действия пируваткиназы, а также многих других ферментов, активность которых подвержена постоянным, хотя и не столь резким изменениям. Соответственно концентрационные зависимости промежуточных продуктов гликолиза должны были так же отразить эти колебания, причем некоторые из этих зависимостей должны были быть синхронны с таковой для NADH, а другие, естественно, не совпадают с ней.

5. В структуре ключевых участвующих ферментов заложена способность принимать то, что можно назвать гликолитическим или глюконеогенным сигналом. Гликолитическая система и пируватдегидрогеназа тормозятся АТФ, цитратом, жирными кислотами и ацетил-СоА при их наивысших физиологических концентрациях. Понижение концентрации всех этих веществ приводит к ослаблению торможения, давая сигнал о том, что не только снижается [АТФ], но уменьшается и поступление главных топливных субстратов окислительной машины митохондрий. Одновременное возрастание [АМР] и [АДР] может служить источником положительных сигналов для активации как гексокиназы, так и фосфофруктокиназы. Как только в результате активации ферментов начинают возрастать концентрации глюкозо-6-фосфата, фруктозодифосфата и глицеральдегид-3-фосфата, каждый из этих продуктов посылает сигнал для активации пируваткиназы. Если, однако, поступление глюкозы невелико и налицо соответствующий приток жирных кислот, то окисление их становится преобладающим процессом; при этом адениновые нуклеотиды полностью заряжены, концентрация интермедиатов цикла лимонной кислоты увеличивается, положительные стимулы гликолиза устраняются и вновь включается торможение гликолиза. Главные факторы, ограничивающие активность фруктозодифосфатазы, следующие: концентрация АМР снижается; повышение [ацетил-СоА] активирует пируваткарбоксилазу; отношение $[NAD^+]/[NADH]$ в цитозоле возрастает, вызывая превращение лактат → пируват; увеличение [пирувата] сдвигает положение равновесия пируватаминотрансферной реакции (гл. 21)



таким образом, что возрастающая концентрация аланина закрепляет торможение пируваткиназы и предшественники глюконеогенеза направляются в сторону глюкозы.

6. Заслуживает внимания механизм контроля системами АТФ/АМФ и NAD^+/NADH . В нормальных аэробных тканях эти системы отрегулированы таким образом, что $[\text{АТФ}]/[\text{АМФ}] = 500$ и $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ изменяется в интервале от 750 до 1000. $[\text{NAD}^+]$ составляет около 1 ммоль/л, $[\text{NADH}] \sim 1$ мкмоль/л. Снижение $[\text{NAD}^+]$ на 10% (до 0,9 ммоль/л) было бы трудно зарегистрировать, если бы оно не приводило к увеличению $[\text{NADH}]$ от $1 \cdot 10^{-6}$ до $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, т. е. в 100 раз. Подобные соображения приложимы и к системе $[\text{АТФ}]/[\text{АМФ}]$. Относительно небольшие изменения в $[\text{NAD}^+]$ или $[\text{АТФ}]$ вызывают относительно большие изменения в $[\text{NADH}]$ или $[\text{АМФ}]$ соответственно и потому приводят к значительному ингибированию или стимуляции гликолиза, глюконеогенеза и синтеза жирных кислот. В стационарном состоянии в нормальной печени преобладает восстановленная форма NADP . Такое отличие от системы NAD/NADH объясняется влиянием концентрации CO_2 на равновесие реакции, катализируемой малик-ферментом. Рассмотрим те две реакции, которые включают пиридинуклеотиды и пируват (последний участвует в обеих реакциях), а именно лактатдегидрогеназную реакцию и реакцию, катализируемую малик-ферментом.

$$[\text{пируват}] = \frac{[\text{лактат}] [\text{NAD}^+]}{[\text{NADH}]} \cdot K_1,$$

$$[\text{пируват}] = \frac{[\text{малат}] [\text{NADP}^+]}{[\text{CO}_2] [\text{NADPH}]} \cdot K_2,$$

$$\frac{[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]}{[\text{NADP}^+]/[\text{NADPH}]} = \frac{K_2 [\text{малат}]}{K_1 [\text{лактат}] [\text{CO}_2]} = 99 \cdot 100.$$

Поскольку $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}] = 1000$, $[\text{NADP}^+]/[\text{NADPH}] = 0,01$.

7. Второй ряд контрольных механизмов основывается на *количествах* присутствующих ферментов. В принципе, как отмечалось ранее в этой главе, ферментный набор печени меняется при рождении от такового у органа, адаптированного к достаточному снабжению углеводами и липидами, которое обеспечивается плацентой, и получающего энергию путем окисления этого постоянно поступающего топливного материала, к набору ферментов необходимого для установления гомеостаза за счет глюкозы крови. Принципиальные изменения заключаются в появлении глюкозо-6-фосфатазы, фруктозо-1,6-дифосфатазы, фосфоенолпируваткарбоксикиназы и различных аминотрансфераз (гл. 21) в цитозоле. Во время переходного периода несколько дней после рождения, необходимого для развития этих ферментов в печени, наблюдается критическая зависимость от соответствующего потребления притока углеводов извне.

14.7.1. Регуляция гликолиза и глюконеогенеза в условиях голодания

В отсутствие притока углеводов с пищей за счет депонированного в печени гликогена лишь несколько часов может обеспечиваться поддержание адекватной концентрации глюкозы в крови. После этого поступление глюкозы в кровь становится зависимым от глюконеогенеза и включаются внутренние контрольные механизмы, рассмотренные выше. Однако наряду с этим процессы глюконеогенеза и гликолиза находятся и под эндокринным контролем, который определяет количественное содержание отдельных ключевых ферментов. Во время продолжительного голодания наблюдается усиленная секреция *глюкокортикоидных* гормонов коры надпочечников (гл. 45); эти гормоны усиливают печеночный синтез фосфоенолпируваткарбоксикиназы, глюкозо-6-фосфатазы (концентрация которой в этих случаях может превышать норму в 5 раз) и аминотрансфераз (гл. 21). Последние, во-первых, делают возможным увеличение скорости превращения глюконеогенных аминокислот (гл. 23) в такие формы, которые могут поступать в глюконеогенный поток (пируват, α -кетоглутарат и оксалоацетат), и, во-вторых, приводят к возрастанию концентрации аланина в печени, что необходимо для ингибирования пируваткиназы. Отметим, что все это те ферменты, которые появляются в периоде, следующем за рождением, и все они могут быть индуцированы прежде времени введением гормонов коры надпочечников.

При голодании секретрируются также адреналин (гл. 45) и глюкагон (гл. 46). Эти гормоны стимулируют образование сАМР с последующим фосфорилированием и инактивацией пируватдегидрогеназы (разд. 12.2.4). Таким образом, в то время как отношение активного к инактивированному ферменту в нормальной почке и печени составляет ~ 2 , при голодании оно может достигать таких низких значений, как 0,2. Благодаря тому что эти же гормоны значительно усиливают липолиз нейтральных триацилглицеринов в жировой ткани с освобождением жирных кислот в кровяное русло, обеспечивается поступление топлива для печени равно, как и приток ацетил-СоА для активации пируваткарбоксилазы. Одновременно в печени примерно до 20% убывает активность глюкокиназы по сравнению с таковой у получавшего корм животного и таким образом сводится к минимуму конкуренция между печенью и другими тканями за глюкозу, которую печень отдает в кровяное русло.

8. Главными источниками углерода для глюконеогенеза служат аминокислоты. В ходе продолжительного голодания мужчины (масса тела 70 кг) такое большое количество белка как 5 кг может расщепиться и быть использованным в качестве источника энергии, эквивалентного 20 000 ккал. Как показано на рис. 14.1,

места входа углерода аминокислот в глюконеогенез находятся в цикле лимонной кислоты. Специфические реакции, благодаря которым отдельные аминокислоты, иные, чем аланин, аспарагиновая и глутаминовая, превращаются в предшественников цикла лимонной кислоты, рассмотрены в гл. 23.

9. Адаптация к богатым углеводами рационам по своему характеру противоположна адаптации к голоданию. Печени крыс, получавших диету, содержащую 75% сахарозы и очень мало жира, характеризовались повышенными концентрациями пируваткиназы, обеих NADP-восстанавливающих дегидрогеназ фосfogлюконатного пути (см. ниже) и ацетил-CoA — карбоксилазы (разд. 17.6.1) и, следовательно, обладали повышенной мощностью в превращении глюкозы в пируват и последнего в свою очередь в жирные кислоты.

Наконец, следует заметить, что во всех тканях наличие кислорода приводит к снижению или остановке гликолиза. Это явление получило название *эффект Пастера* и было впервые обнаружено этим ученым у микроорганизмов. В настоящее время очевидно, что за большинство аспектов эффекта Пастера могут быть ответственные регуляторные свойства фосфоглюконкиназы. Ингибирование этого фермента АТР, цитратом и т. д. отражает эффекты, связанные с функционированием окислительного фосфорилирования, в то время как стимуляция ADP, AMP и P_i отражает ситуацию, когда имеется дефицит кислорода (рис. 14.9).

14.8. Фосfogлюконатный окислительный путь

Существование альтернативного пути для окисления глюкозы с образованием CO_2 и пентоз было обозначено на рис. 14.1. Используя ряд цитоплазматических ферментов, совершенно независимых от ферментов гликолиза, и объединяя их с некоторыми гликолитическими ферментами, не трудно представить себе, каким образом этот ряд реакций мог бы приводить к полному окислению глюкозы до CO_2 . Однако такой подход означал бы неверную интерпретацию метаболического значения указанного пути, который выполняет две основные роли: источника восстановительных эквивалентов для восстановления $NADP^+$ в NADPH и механизма, синтезирующего и поставляющего пентозы.

В фосfogлюконатном пути АТР требуется лишь для образования глюкозо-6-фосфата и нигде не генерируется. В противоположность гликолизу и циклу лимонной кислоты функционирование этой последовательности нельзя представить в виде ряда превращений, приводящих прямо от глюкозо-6-фосфата к шести молекулам CO_2 . Для понимания фосfogлюконатного пути желательно сначала рассмотреть участвующие ферменты, их субстраты и продукты реакций. Реакции суммированы на рис. 14.11.

Глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназа. Фермент млекопитающих, а также фермент из большинства, хотя и не из всех других, источников катализирует NADP^+ -зависимое окисление глюкозо-6-фосфата. Первая стадия реакции заключается в образовании δ -лактона; это свободно обратимый процесс. Хотя лактон исключительно нестабилен и спонтанно гидролизуется, гидролиз ускоряется спе-

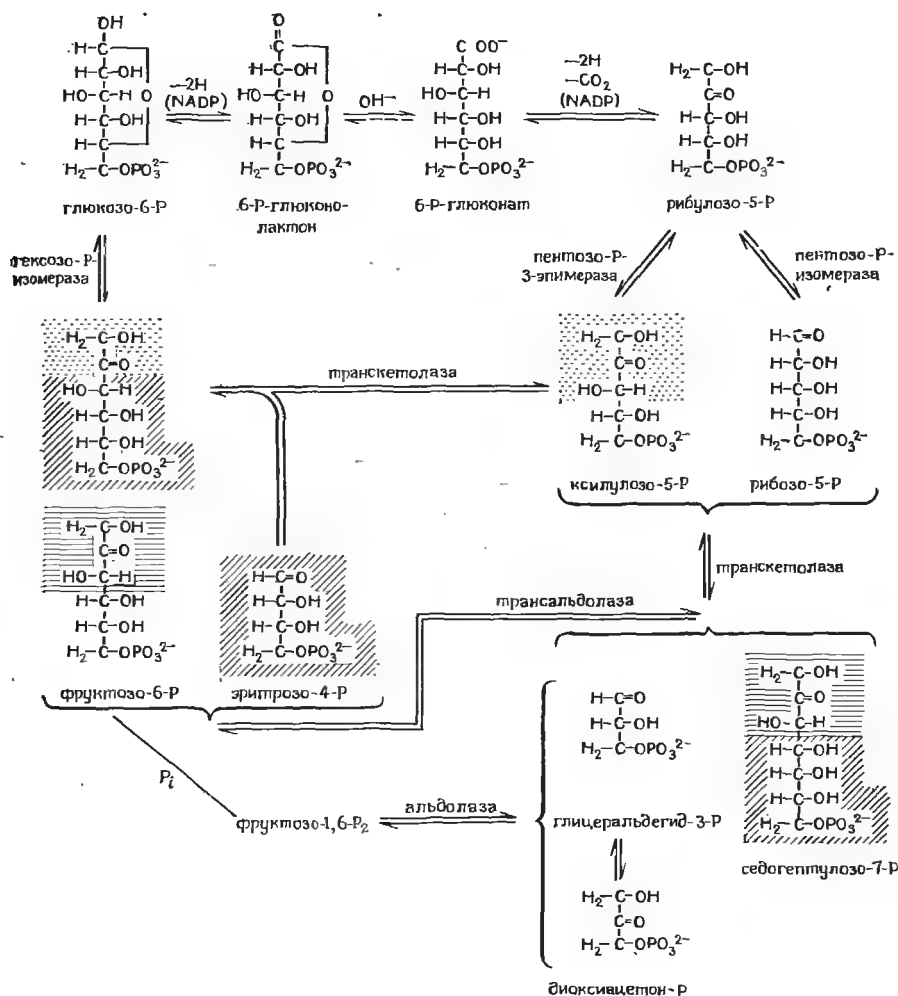
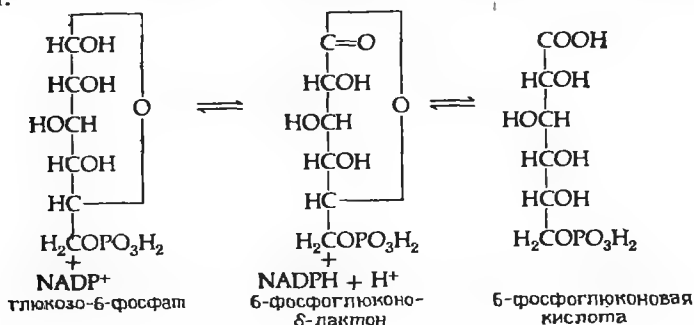


Рис. 14.11. Реакции фосфоглюконатного окислительного пути. [Horecker B. L., in: A. Kornberg, B. L. Horecker, L. Cornudella, J. Oró, eds., *Reflections on Biochemistry*, Pergamon Press., New York, 1976, p. 69.]

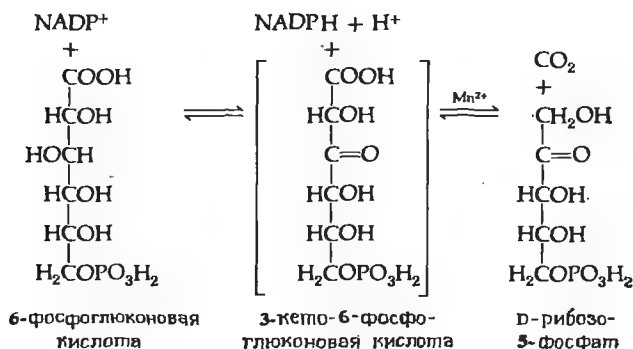
цифической *лактоназой*. Равновесие процесса в целом сильно сдвинуто вправо. Дегидрогеназа представляет димер субъединиц с молекулярной массой по 67 500; фермент проявляет отрицательную кооперативность; его действие легко подавляется продуктом реакции NADPH . $K_m^{\text{глюкозо-6-P}} = 3,6$ мкмоль/л; $K_m^{\text{NADP}} = 5,4$ мкмоль/л.

Особый интерес к этому ферменту обусловлен тем, что при его полном отсутствии или же наличии в эритроцитах одного из нескольких генетических его вариантов появляется тяжелая форма анемии (гл. 32). Те варианты фермента, которые наиболее совместимы с клеточными условиями, характеризуются более высоким сродством к NADP^+ , что способствует снижению его концентрации, необходимой для связывания в каталитическом центре; NADPH — это конкурентный ингибитор NADP^+ . Для варианта A $K_m^{\text{NADP}^+}$ довольно низка. Таким образом, хотя количество имеющегося фермента ограничено, он полностью активен и оборачивается быстрее, чем это может делать нормальный фермент при существующих условиях в клетке; это очень важно, поскольку содержащий вариант A эритроциты не обладают какой-либо иной формой дегидрогеназы. Вариант B , однако, серьезно лимитирует жизнь клетки, так как $K_m^{\text{NADP}^+}$ превосходит $[\text{NADP}^+]$, доступную для эритроцита; у таких людей часто развивается гемолитическая анемия.

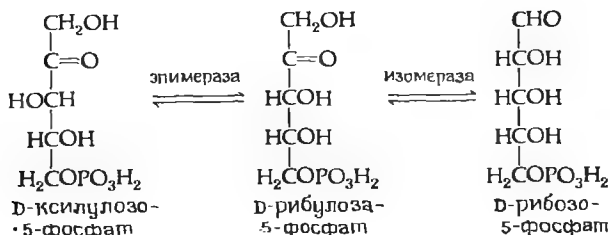


Фосфоглюконатдегидрогеназа. Дальнейшее окисление 6-фосфоглюконата катализируется NADP^+ - и Mn^{2+} -зависимыми ферментами, которые осуществляют окислительное декарбоксилирование β-оксикислот и поэтому подобны малик-ферменту и изоцитратдегидрогеназе. Являющаяся промежуточным продуктом β-кетокислота не изолирована и предполагают, что она подвергается декарбоксилированию в момент своего образования на поверхности фермента. Фермент печени крысы состоит из двух одинаковых субъединиц с мол. массой по 51 000. Поскольку фермент ингибируется NADPH ($K_i = 20$ мкмоль/л) и $K_m^{\text{NADP}^+}$ составляет 15 мкмоль/л, то при нормальных концентрациях в печени этот фер-

мент обычно полностью блокирован; начинает функционировать только после того, как NADPH окисляется в ходе какого-либо процесса, например при синтезе жирных кислот.



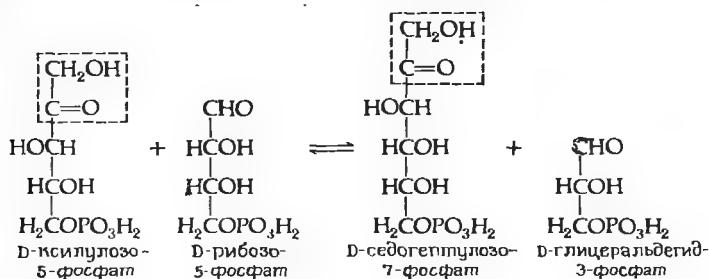
Взаимопревращения пентоз. Фосфопентозоизомераза катализирует взаимодействие кетопентозных и альдопентозных форм — реакцию формально близкую к действию гексозофосфатизомеразы (разд. 14.4.1) и фосфотриозоизомеразы (разд. 14.4.2). Продуктом реакции является тот рибозо-5-фосфат, который требуется для синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Остальную часть превращений в этом «пути» составляет устройство для распределения рибозо-5-фосфата, который может образоваться либо в ходе указанных реакций, либо при распаде нуклеиновых кислот. Эта часть пути начинается с превращения фонда рибозо- и рибулозо-5-фосфатов в ксилулозо-5-фосфат.



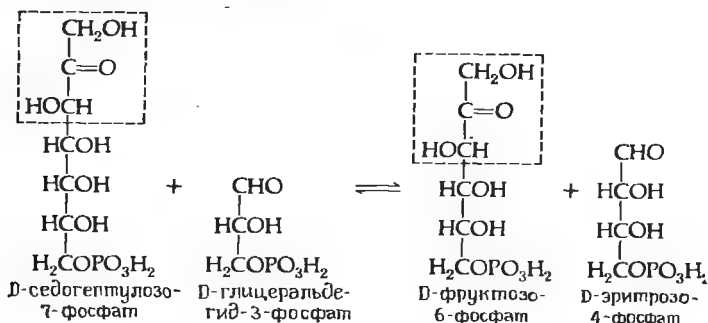
Фосфопентозоэпимераза катализирует эпимеризацию у атома C-4; предполагают, что механизм реакции включает промежуточное образование 2:3-эндьола. Фермент из *E. coli* состоит из трех идентичных субъединиц (мол. масса 35 000).

Транскетолаза. D-Ксилулозо-5-фосфат служит источником активного гликолевого альдегида в транскетолазной реакции. Фер-

мент состоит из двух идентичных субъединиц, каждая с мол. массой по 70 000, использует тиаминпирофосфат как кофермент, требует для своего действия Mg^{2+} и катализирует перенос двухуглеродного фрагмента от 2-кетосахара к атому С-1 различных альдоз. Донорная кетоза должна обладать L-конфигурацией при С-3; образующаяся кетоза имеет ту же конфигурацию. К числу наиболее важных реакций, катализируемых транскетолазой, относится реакция, в которой продуцируется семиуглеродный сахар седогептулоза. «Активная гликольальдегидная» группа представляет собой α, β -диоксиэтилтиаминпирофосфат — соединение, напоминающее «активный» ацетальдегид, образуемый в ходе окислительного декарбоксилирования пирувата (разд. 12.2.1); механизмы этих реакций подобны. При транскетолазной реакции не появляется свободный гликолевый альдегид, реакция легко обратима.



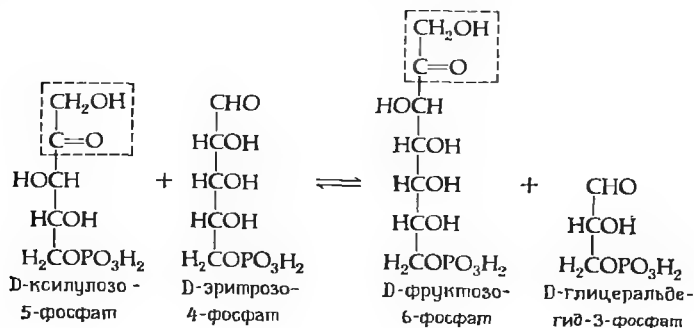
Трансальдолаза. Другой фермент этого ряда — *трансальдолаза* — катализирует перенос углеродных атомов 1, 2 и 3 от кетозофосфата на С-1 альдозофосфата. Три изофермента трансальдолазы обнаружены у дрожжей (мол. масса 77 000, 68 000 и 64 000); каждый состоит из двух субъединиц.



Хотя реакция кажется подобной альдолазной реакции (разд. 14.4.2), свободный диоксиацетон или его фосфатный эфир

не могут служить субстратами и не появляются также в ходе реакции; фермент катализирует только реакции переноса, в ходе которых между карбонилем переносимого диоксиацетонового фрагмента и ϵ -аминогруппой лизинового остатка фермента образуется промежуточное шиффово основание. Подобным образом связывание субстрата происходит и при действии альдолазы (разд. 14.4.2), и считают, что трансальдолазная реакция идет точно таким же путем, за исключением неспособности инициироваться свободным диоксиацетоном.

Эритрозо-4-фосфат, возникающий под действием трансальдолазы, может превращаться по нескольким известным метаболическим путям, один из которых заключается в присоединении двухуглеродного фрагмента в реакции, катализируемой транскетолазой, с образованием фруктозо-6-фосфата. У растений и микроорганизмов эритрозо-4-фосфат участвует также в синтезе фенилаланина (гл. 20).



Циклический характер фосфоглюконатного окислительного пути. Выше уже рассматривались все ферменты и промежуточные продукты, характерные для этого пути. Для его действия, однако, требуются еще четыре фермента, участвующих в гликолизе. Это фосфотриозоизомеразы, катализирующая взаимопревращение глицеральдегид-3-фосфата и диоксиацетонфосфата, альдолаза, катализирующая образование фруктозо-1,6-дифосфата из двух триозофосфатов, фруктозо-1,6-дифосфатаза, гидролизующая фруктозо-1,6-дифосфат до фруктозо-6-фосфата, и глюкозофосфатизомеразы, превращающая фруктозо-6-фосфат в глюкозо-6-фосфат. Как известно, это те ферменты, которые участвуют в образовании гексоз из триоз путем обращения гликолитической последовательности.

Памятуя о всех написанных выше реакциях, можно реконструировать систему, в которую непрерывно поступает глюкоза и из которой выходит CO_2 в качестве единственного углеродного соединения. В этом можно убедиться путем рассмотрения ряда балансовых уравнений, представленных в табл. 14.3, которые в итоге

описывают превращение 6 молей гексозофосфата в 5 молей гексозофосфата и 6 молей CO_2 . Отметим, что единственная реакция, при которой выделяется CO_2 , — это реакция окисления 6-фосфоглюконовой кислоты.

На первый взгляд предлагаемое описание последовательности реакций кажется довольно трудным, но оно может стать более понятным, если принять во внимание следующие соображения. Действие фосfogлюконатного пути как *окислительного* механизма полностью завершается на стадиях 1 и 2, когда NADP^+ восстанавливается и CO_2 выделяется. Окисление 6 молей гексозы в стадиях 1 и 2 приводит к отдаче 12 пар электронов NADP^+ , т. е. именно того количества, которое образуется при полном окислении 1 моля глюкозы до 6 молей CO_2 . В результате стадии 2 остается 6 молей рибулозо-5-фосфата. Если он используется в процессе синтеза нуклеотидов и т. д., то должна лишь произойти его изомеризация в рибозо-5-фосфат. Однако если углеродные атомы 6 молей пентозы подвергаются перестройке с образованием 5 молей гексозы, то это, по крайней мере теоретически, есть следствие полного окисления одного из исходных 6 молей глюкозы. Такая трансформация углерода пентоз в гексозы начинается на стадиях 3 и 4, и в результате на балансе остаются 2 моля тетроз и 2 моля пентоз. Стадия 5 приводит к получению из этих продуктов дополнительных 2 молей гексозы и 2 молей триозы. В стадиях 5—8 осуществляется превращение двух триоз в одну гексозу. В каждой серии реакций образующаяся гексоза представляет собой фруктозо-6-фосфат. Наконец, путем изомеризации последнего возникают 5 молей глюкозо-6-фосфата, который может вновь войти в последовательность со стадии 1 и т. д.

Попытки измерить относительные количества глюкозы, превратившейся через гликолитический и фосfogлюконатный пути, были основаны на том, что в последнем случае весь образуемый сначала CO_2 должен происходить только из C-1 глюкозы, в то время как при совместном действии гликолиза и цикла лимонной кислоты начальные скорости выделения $^{14}\text{CO}_2$ из $1\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозы и $6\text{-}^{14}\text{C}$ -глюкозы не должны различаться. В поперечнополосатой мышце млекопитающих, по-видимому, не происходит прямого окисления глюкозы через фосfogлюконат, и катаболизм глюкозы идет целиком через гликолиз и цикл лимонной кислоты. В печени существенная часть (вероятно, 30% или более) CO_2 , возникающего из глюкозы, образуется при действии фосfogлюконатного окислительного пути. В молочной железе, семенниках, жировой ткани, лейкоцитах и коре надпочечников млекопитающих даже более высокая доля глюкозного катаболизма происходит через окисление фосfogлюконата. Преимущества, которые организм получает в результате функционирования фосfogлюконатного пути, кроме образования пентоз для синтеза нуклеотидов, по-видимому, связаны с тем, что процесс

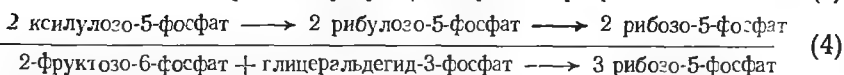
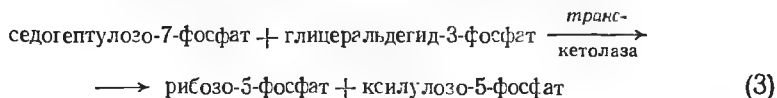
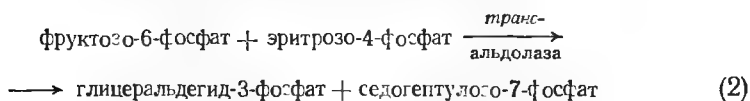
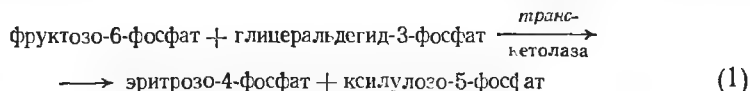
Таблица 14.3
Реакции фосфоглюконатного окислительного пути

Стадия	Фермент	Реакция	Баланс углерода
1	Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа	6 глюкозо-6-фосфат + 6NADP+ $\longrightarrow$ 6 6-фосфоглюконат + 6NADPH + 6H+	6(6) $\longrightarrow$ 6(6)
2	Фосфоглюконатдегидрогеназа	6 6-фосфоглюконат + 6 NADP+ $\longrightarrow$ 6 рибулозо-5-фосфат + 6NADPH + 6H+ + 6CO ₂	6(6) $\longrightarrow$ 6(5) + 6(1)
3	Пентозоэпимераза Пентозоизомераза Транскетолаза	2 рибулозо-5-фосфат $\longrightarrow$ 2 ксилулозо-5-фосфат 2 рибулозо-5-фосфат $\longrightarrow$ 2 рибызо-5-фосфат 2 ксилулозо-5-фосфат + 2 рибызо-5-фосфат $\longrightarrow$ 2 седогептулозо-7-фосфат + 2 глицеральдегид-3-фосфат	2(5) $\longrightarrow$ 2(5) 2(5) $\longrightarrow$ 2(5) 2(5) + 2(5) $\longrightarrow$ 2(7) + 2(3)
4	Трансальдолаза	2 седогептулозо-7-фосфат + 2 глицеральдегид-3-фосфат $\longrightarrow$ 2 эритрозо-4-фосфат + 2 фруктозо-6-фосфат	2(7) + 2(3) $\longrightarrow$ 2(4) + 2(6)
5	Пентозоизомераза Транскетолаза	2 рибулозо-5-фосфат $\longrightarrow$ 2 ксилулозо-5-фосфат 2 ксилулозо-5-фосфат + 2 эритрозо-4-фосфат $\longrightarrow$ $\longrightarrow$ 2 глицеральдегид-3-фосфат + 2 фруктозо-6-фосфат	2(5) $\longrightarrow$ 2(5) 2(5) + 2(4) $\longrightarrow$ 2(3) + 2(6)
6	Триозоизомераза	глицеральдегид-3-фосфат $\longrightarrow$ диоксиацетонфосфат	(3) $\longrightarrow$ (3)
7	Альдолаза	диоксиацетонфосфат $\longrightarrow$ глицеральдегид-3-фосфат $\longrightarrow$ фруктозо-1,6-дифосфат	(3) + (3) $\longrightarrow$ (6)
8	Фосфатаза	фруктозо-1,6-дифосфат $\longrightarrow$ фруктозо-6-фосфат + P _i	(6) $\longrightarrow$ (6)
9	Гексозоизомераза	5 фруктозо-6-фосфат $\longrightarrow$ 5 глюкозо-6-фосфат	5(6) $\longrightarrow$ 5(6)
Суммарный процесс:			
		6 глюкозо-6-фосфат + 12NADP+ $\longrightarrow$ 5 глюкозо-6-фосфат + 6CO ₂ + 12NADPH + 12H+ + P _i	6(6) $\longrightarrow$ 5(6) + 6(1)

не нуждается в дополнительной затрате АТФ, не зависит от наличия четырехуглеродных дикарбоновых кислот цикла лимонной кислоты и, что, вероятно, наиболее важно, использует NADP^+ в качестве единственного акцептора электронов. Как указано ранее (разд. 12.5), маловероятно, чтобы АТФ могла эффективно образовываться путем митохондриального окисления NADPH , образующегося в цитоплазме. Большая часть генерированного в фосфоглюконатном пути NADPH используется в качестве восстанавливающего агента, особенно при синтезе жирных кислот и стероидов. Это согласуется с распределением соответствующих ферментов в различных органах. Печень, молочная железа, семенники и кора надпочечников — места активного синтеза жирных кислот и/или синтеза стероидов, в то время как эти процессы не характерны для метаболизма поперечнополосатой мышечной ткани, где не обнаружено окисления фосфоглюконата.

Действие фосфоглюконатного пути, очевидно, зависит от наличия NADP^+ . В печени скорость процесса контролируется двумя путями. 1. Количество обеих дегидрогеназ резко уменьшается даже после короткого периода голодания и достигает прежнего уровня в течение нескольких часов после кормления. 2. Оба фермента чрезвычайно чувствительны к величине отношения $[\text{NADP}^+]/[\text{NADPH}]$. При величине соотношения 0,02 их активность максимальна, при 0,01 она уменьшается на 90%.

Анаэробное происхождение рибозы. Как описано выше, окисление глюкозо-6-фосфата дает возможность для образования рибозы. Однако любая клетка, наделенная транскетолазой, трансальдолазой, ферментами взаимопревращения пентоз и обычными ферментами гликолиза, может также производить рибозо-5-фосфат неокислительным путем, как это видно из следующих уравнений:

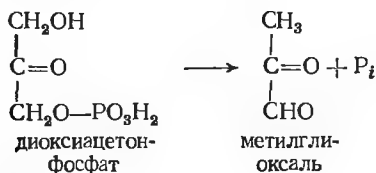


Величины относительных вкладов окислительного и неокислительного путей для итогового образования пентозы в животных тканях невыяснены.

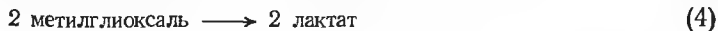
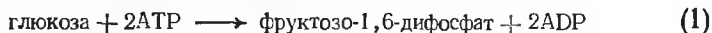
Образование *p*-дезоксирибозного компонента нуклеотидной единицы ДНК происходит путем превращения соответствующих рибонуклеотидов; это изложено в гл. 24.

14.8.1. Метилглиоксальный окольный путь

Метилглиоксаль был обнаружен в тканевых автолизатах полвека назад. Позднее было убедительно доказано широкое распространение *глиоксалазы*, катализирующей превращение метилглиоксала в лактат (13.5). Однако смысл этих данных оставался непонятным, поскольку источник метилглиоксала не был выявлен. Это соединение приобрело новое значение в связи с описанием *метилглиоксальсинтазы*, изолированной из *E. coli* и *P. vulgaris*. Катализируемая реакция такова:



Фермент, димер из идентичных субъединиц (мол. масса 67 000) с K_m от 0,2 до 0,5 ммоль/л, действует при физиологических концентрациях субстрата. Синтаза проявляет аллостерические свойства с субстратом, но только в присутствии P_i , который при более высокой концентрации ведет себя как ингибитор, каковыми являются фосфоенолпируват, 3-фосфоглицерат и PP_i . Этот фермент и глиоксалаза могут образовать окольный путь, минуя идущие с малым выходом АТФ стадии гликолиза:

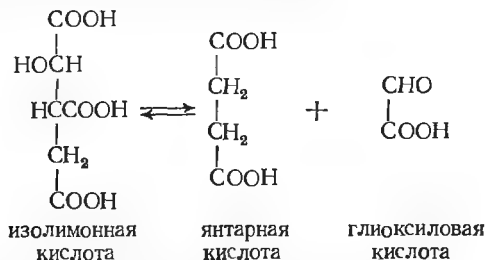


Хотя этот процесс и перекрывает возможности для образования АТФ, он подготавливает углерод глюкозы для использования в синтезе жирных кислот, в цикле трикарбоновых кислот и в синтезе некоторых аминокислот. Наряду с этим путь образования метилглиоксала мог бы служить в качестве приспособления для освобождения P_i при его дефиците, который может возникать вследствие накопления слишком больших количеств фруктозодифосфата. Биологическое распространение и метаболическая роль этого окольного пути нуждаются в исследовании.

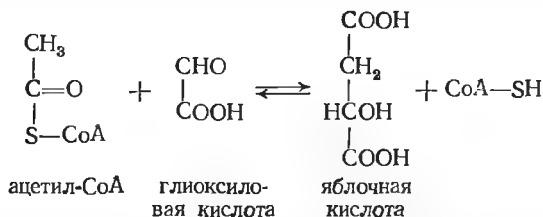
14.9. Некоторые альтернативные пути метаболизма углеводов в растениях и микроорганизмах

14.9.1. Путь глиоксильной кислоты

Дополнительный путь для генерации дикарбоновых кислот функционирует в растениях и микроорганизмах, но не обнаружен в тканях животных. Этот путь становится возможным благодаря двум специфическим ферментам — изоцитрат-лиаза и малат-синтазе. В растениях эти ферменты связаны с субклеточными частицами, которые называются глиоксисомами. Изоцитрат-лиаза катализирует реакцию, обратную реакции альдольной конденсации:



Эта реакция не нуждается в дополнительной энергии в отличие от обсуждавшейся ранее (разд. 14.5.1) реакции при участии АТР-цитрат-лиазы, потому что продуктом реакции являются две кислоты, а не ацил-СоА. В противоположность бактериальной цитрат-лиаза (разд. 14.5.1) изоцитрат-лиаза не включает белок-переносчик, и при ее действии не происходит образования промежуточного сукцинилфермента. У *E. coli*, где изоцитрат-лиаза индуцируется при выращивании на ацетате, фосфоенолпируват служит как репрессором биосинтеза этого фермента, так и аллостерическим ингибитором уже существующего фермента. Малат-синтаза катализирует конденсацию ацетил-СоА с глиоксильной кислотой при образовании малата, т. е. реакцию, аналогичную образованию цитрата из оксалоацетата (разд. 12.2.2.):



Во взаимодействии с описанными ранее ферментами цикла лимонной кислоты упомянутые два фермента обеспечивают чистый выход сукцината за счет конденсации ацетил-СоА с глиоксильной кислотой (рис. 14.12). Суммарная реакция описывается следующим уравнением:



Образовавшийся сукцинат может подвергнуться превращениям в реакциях цикла лимонной кислоты до оксалоацетата, который затем может реагировать с ацетил-СоА. В другом варианте оксалоацетат может превратиться в фосфоенолпируват и далее в глюкозу. Таким образом, углерод ацетил-СоА, полученный при окислении жирных кислот (гл. 17), может быть утилизирован для синтеза углеводов.

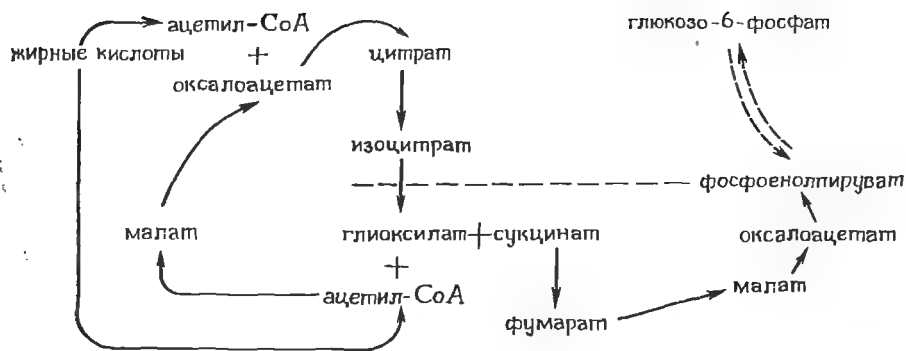
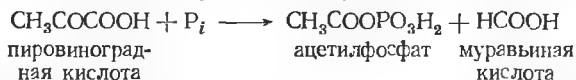


Рис. 14.12. Глиоксилатный цикл. Окисление жирных кислот дает ацетил-СоА, вступающий в цикл в двух точках. Каждый оборот цикла приводит к генерации одной молекулы сукцината. Последний может быть окислен до оксалоацетата в системе реакций цикла лимонной кислоты (рис. 12.1); оксалоацетат декарбоксилируется и фосфорилируется до фосфоенолпирувата (разд. 14.5.1); последний превращается в глюкозо-6-фосфат путем обращения гликолитической последовательности (рис. 14.1). Следовательно, для образования двух молекул сукцината, дающих одну молекулу гексозы и две молекулы CO_2 , требуется затрата четырех молекул ацетил-СоА. Прерывистая линия показывает ингибиторное влияние фосфоенолпирувата на функционирование изоцитрат-лиазы.

дов. Это превращение, не имеющее места у животных, может происходить у растений и различных микроорганизмов благодаря действию изоцитрат-лиазы и малат-синтазы, отсутствующих в тканях животных. Главный контроль скорости этого процесса, по-видимому, осуществляется за счет [фосфоенолпирувата], поскольку это соединение является отрицательным эффектором изоцитрат-лиазы.

14.9.2. Метаболизм ацетилфосфата у микроорганизмов

Большинство микроорганизмов, подобно клеткам животных, окисляет пируват до ацетил-СоА, который вступает в цикл лимонной кислоты. Альтернативным путем является фосфокластическое расщепление у *E. coli*:



Ацетилфосфат под действием фосфотрансацетилазы может превращаться в ацетил-СоА

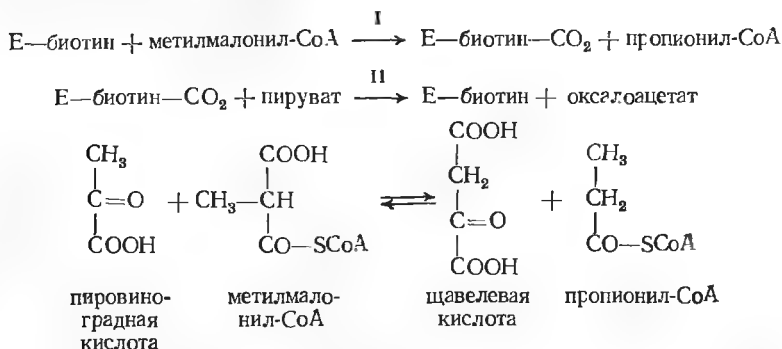


У некоторых микроорганизмов фосфатная группа ацетилфосфата может использоваться вместо АТФ в процессе фосфорилирования различных гексоз.

14.9.3. Биосинтез пропионовой кислоты у микроорганизмов

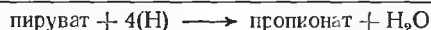
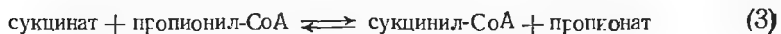
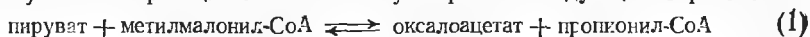
У пропионовокислых бактерий исходным моментом в синтезе пропионовой кислоты является необычный перенос CO_2 от метилмалонил-СоА на пировиноградную кислоту, который катализируется биотинсодержащим ферментом, метил-

малонил-СoА—**карбоксилтрансферазой** (мол. масса 790 000). Фермент включает полипептидные цепи трех типов, причем общее число их равняется шести. Кроме того, фермент содержит шесть эквивалентов либо Zn^{2+} , либо Co^{2+} , либо обоих вместе, что зависит от состава среды. Один из трех полипептидов содержит биотин, как обычно соединенный с ϵ -аминогруппой лизина. Как и у других ферментов этого типа, биотин служит здесь для акцептирования и переноса CO_2 , и биотин-полипептид — субстрат для двух других белков, различающихся по своим ферментным свойствам:



Образовавшийся оксалоацетат восстанавливается в сукцинат путем обращения обычных реакций цикла лимонной кислоты через малат и фумарат. *Трансизоэстераза* катализирует перенос CoA-фрагмента с пропионил-CoA на сукцинат, образуя свободный пропионат и сукцинил-CoA.

Конечная стадия этого процесса состоит в регенерации метилмалонил-CoA из сукцинил-CoA. Эта реакция катализируется *метилмалонил-CoA-мутазой*, кофактором которой служит *диметилбензимидазолкобальмид* (гл. 50), производное витамина B_{12} . Механизм этой реакции обсуждается далее (разд. 17.5.7). Последовательность указанных реакций может быть суммирована следующим образом:



Метаболизм пропионата в тканях животных, представляющий по существу обращение этого пути, обсуждается в гл. 17.

14.9.4. Пути превращений ацетальдегида

Ранее было отмечено, что ацетальдегид, образующийся при декарбоксилировании пирувата, восстанавливается в этанол в ходе анаэробного брожения. В некоторых аэробных брожениях, как, например, при производстве уксуса, конечным продуктом процесса является уксусная кислота. Это может достигаться за счет гидролиза ацетил-CoA, или ацетилфосфата, или путем окисления ацетальдегида. Известен ряд ферментов, катализирующих последнюю реакцию, в том числе *глицеральдегидфосфатдегидрогеназа* (разд. 14.4.2.). У млекопитающих эта реакция происходит при участии *альдегидоксидазы* печени, *ксантиноксидазы* или *NAD-зависимой альдегиддегидрогеназы*.

См. литературу к гл. 15.

Глава 15

МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ. II

Метаболизм гликогена и его контроль.

Взаимопревращение гексоз.

Олигосахариды и синтез полисахаридов.

Клеточные стенки растений и бактерий

В этой главе излагаются общие сведения о метаболизме и физиологической роли полисахаридов — обязательных компонентов всех организмов, в которых они служат как депо для запасаания энергии, как структурные элементы механического остова клетки и как модуляторы многих разнообразных функций белков и сложных липидов. После рассмотрения роли полисахаридов в процессах запасаания энергии будут описаны механизмы превращения глюкозы в другие моносахариды, а далее сделан краткий обзор современных представлений о синтезе олигосахаридов и гетерополисахаридов.

15.1. Полисахариды как резервы энергии

Живые клетки не могут продолжительное время существовать без источника энергии. Накопление энергии в микроорганизмах либо незначительно, либо совсем не происходит до тех пор, пока каким-то образом окружающая среда не начинает ограничивать рост; если это имеет место, то в присутствии подходящего субстрата происходит синтез резервных полисахаридов. В листьях растений производится сахароза, которая транспортируется в нефотосинтезирующие ткани; в листьях сахароза накапливается в виде крахмала с тем, чтобы использовать его в темноте. Животные, получающие питание порциями (приемы пищи), накапливают гликоген (разд. 2.3.2.1) главным образом в печени и мышцах. Когда происходит значительное уменьшение количества гликогена в печени, приобретают значение процессы печеночного и почечного глюконеогенеза, которые важны не столько для покрытия энергетических потребностей самих этих органов, сколько для того, чтобы обеспечить непрерывный приток глюкозы к нервной ткани, для которой это необходимо всегда, и к скелетным («белым») мышцам, для того чтобы, пока они находятся в состоянии покоя, мак-

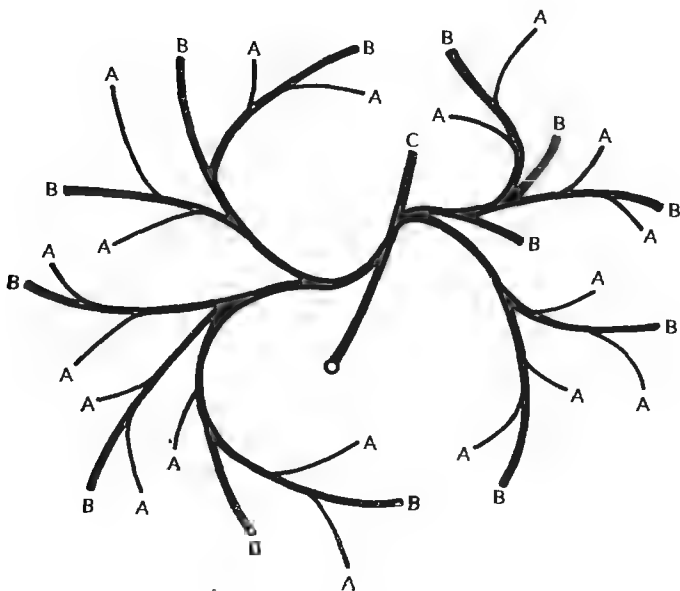


Рис. 15.1. Схематическое изображение структуры молекулы гликогена. Кружочек показывает редуцирующий концевой остаток в первичной цепи, соединенный 1,4-связью. В-цепи — иные, чем С-цепь, к которым дополнительные цепи присоединены α -1,6-связью; А-цепи — наружные цепи, вдоль которых нет ветвлений. Как можно видеть, в наружных участках молекулы приблизительно два конца А-цепи приходятся на каждый конец В-цепи, как это имеет место в случае гликогена печени.

симально обеспечить их гликогеном, который мог бы быть употреблен в качестве исходного материала в анаэробном гликолизе при сокращении. В табл. 15.1 приведены некоторые резервные полисахариды, имеющиеся в биологических системах. Каждая резервная форма позволяет аккумулировать эффективный запас сахаров, причем этот запас делается в виде недиффундирующих молекул, которые допускают лишь минимальное накопление связанной воды и, таким образом, оказывают очень малый осмотический эффект. Действительно, гликоген и амилопектин накапливаются как нерастворимые гранулы, с которыми тесно связаны ферменты, катализирующие как их синтез, так и их расщепление.

Наиболее важные свойства гликогена, обусловленные его структурой, иллюстрируются рис. 15.1. Поскольку внутри клеток все резервные гомополисахариды расщепляются с последующим освобождением моносахаридных единиц от нередуцирующих концов цепей, то ясно, что чем больше ветвлений имеется в молекуле, тем больше возможностей для ферментной атаки. В присутствии

Таблица 15.1
Некоторые запасные полисахариды

Источник	Полисахарид	Моносахаридный компонент	Гликозильный донор	Структура полимера	Количество моносахаридных остатков
Мышца	Гликоген	Глюкоза	UDP-глюкоза	α -1,4 с α -1,6-точками ветвления	$>10\ 000$
Различные бактерии	«Гликоген»	»	ADP-глюкоза	α -1,4 с более редкими α -1,6-точками ветвления	$>5\ 000$
Зеленые водоросли	Амилоза	»	»	Линейный α -1,4	~ 600
Высшие растения (листья, стебель, корни, семена некоторых растений)	Амилопектин	»	»	Линейный α -1,4 с α -1,6-точками ветвления	$\sim 6\ 000$
Бурые водоросли	Ламинарин	»	UDP-глюкоза	β -1,3 с β -1,6-точками ветвления	>20
Травяные злаки	Флеан	Фруктоза	Сахароза	β -2,6; одна глюкоза на редуцирующем конце, несколько 1,2-точек ветвлений	~ 30
Некоторые хлебные злаки, стебли, корни	Инулин	Фруктоза	»	β -2,1; несколько 2,6-точек ветвления; одна глюкоза на редуцирующем конце	~ 40

соответствующего фермента и при определенном числе молекул полисахарида справедливо следующее: чем больше ветвей имеется в структуре, тем быстрее освобождение моносахаридных единиц. При мышечном сокращении мышечные клетки испытывают увеличение потребности в АТР в пределах от 100—1000 раз (в минуту). Поэтому сильно разветвленная структура гликогена (точки ветвления примерно у каждого 12-го остатка глюкозы вдоль цепи) более выгодна, чем менее разветвленная структура амилопектина (ветвление через 24 остатка) или каких-либо других простых линейных полисахаридов. В действительности от 8 до 10% всех глюкозных остатков молекулы гликогена всегда находятся на передупуцирующих концах этой сильно разветвленной структуры и могут быть освобождены под действием фермента.

15.2. Метаболизм гликогена

Самый важный аспект метаболизма гликогена заключается в том, что при благоприятных условиях он может накапливаться, а в случае потребности в глюкозе расщепляться. Благодаря участию независимых ферментных систем в синтезе и расщеплении гликогена оба этих процесса регулируются таким образом, что могут протекать в соответствии с запросами клетки при данных существующих в ней условиях. За исключением реакции



представленная схема метаболизма гликогена (рис. 15.2) справедлива для всех животных клеток. Гидролиз глюкозо-6-фосфата свойствен только печени, почкам и слизистой оболочке кишечника — органам, клетки которых выделяют глюкозу в систему кровообращения.

Основные характеристики метаболизма гликогена в скелетной мышце значительно отличаются от таковых в печени. Покоящаяся мышца независимо от поступления глюкозы способна накапливать гликоген в количествах, соответствующих не более 1%-ному раствору, и должна расщеплять гликоген исключительно быстро, когда внутриклеточная [АТР] снижается в связи с потреблением АТР в процессе сокращения. Печень может накапливать гликоген в большем количестве, соответствующем 5%-ному раствору, если концентрация глюкозы в крови находится в пределах нормы или повышена; в печени гликоген может расщепляться до глюкозы с целью выхода последней в кровяное русло, когда [глюкоза] в крови ниже нормы. Последний процесс может осуществляться довольно быстро, но по скорости никак не может сравниться с почти взрывоподобным освобождением глюкозо-1-фосфата, происходящим в сокращающейся мышце. Таким образом, хотя промежуточные продукты и ферменты метаболизма гликогена в общем

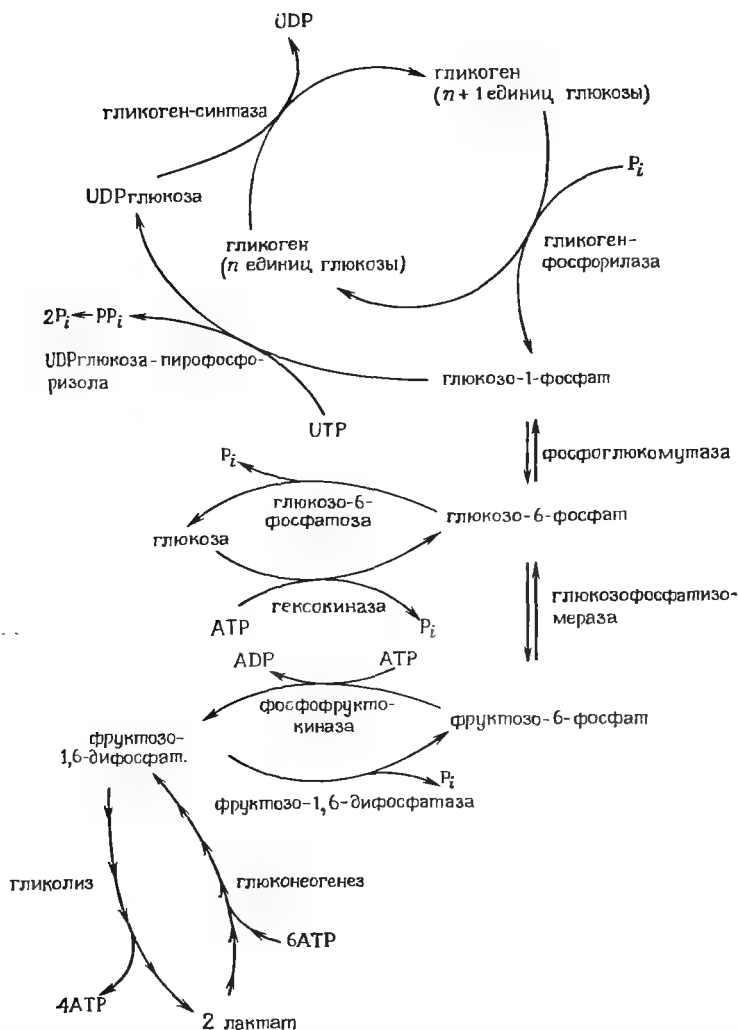


Рис. 15.2. Метаболизм гликогена в печени. Обратимые стрелки обозначают реакции, катализируемые в обоих направлениях тем же самым ферментом. Закругленные стрелки указывают на существование иных ферментов для обратных реакций. В мышце не может происходить гидролиз глюкозо-6-фосфата до глюкозы; регенерации гликогена из лактата *in vivo* не имеет существенного значения в мышце.

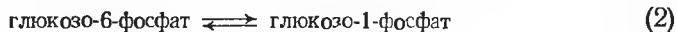
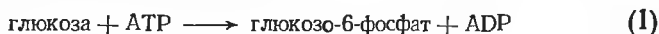
похожи в этих двух тканях, механизмы их регуляторного контроля несколько различаются. Детали метаболизма гликогена в мышце лучше известны, чем в печени, и обсуждаются в первую очередь.

15.3. Метаболизм гликогена в скелетной мышце

15.3.1. Гликогенолиз

Главный результат анаэробного гликолиза (гл. 14) — превращение одной молекулы глюкозы в лактат, сопровождающееся выходом двух молекул АТР, причем этот процесс не нуждается в участии кислорода. Поскольку, однако, приток O_2 к тканям млекопитающих практически постоянен, так же как в стационарном состоянии постоянна потребность в АТР, то лишь для немногих животных тканей этот аспект гликолиза имеет значение, за исключением, пожалуй, нескольких предельных мгновений отсутствия кислорода. Лишь отдельным типам клеток, в том числе клеткам сетчатки, свойственна значительная скорость аэробного гликолиза, когда в кровоток выбрасывается лактат даже при нормальных артериальных концентрациях глюкозы и O_2 . Заметным исключением далее является сокращающаяся скелетная (белая) мышца. Потребность в АТР для скелетной мышцы, переходящей от покоя к повторным максимальным сокращениям, значительно превосходит количество АТР, которое может быть получено при использовании всего O_2 и окисляемых метаболитов, которыми она располагает в состоянии покоя; при таких условиях исключительное значение в качестве источника АТР приобретает анаэробный гликолиз. Как можно видеть из рис. 15.2, энергия гликозидной связи гликогена при этом процессе сохраняется; только P_i требуется для превращения полисахарида в глюкозо-6-фосфат. Отсюда следует, что в анаэробнозе выход АТР из гликогена составляет три молекулы на глюкозный эквивалент, но если процесс начинается непосредственно с глюкозы, то он равен только двум молекулам АТР.

Как можно также видеть из схемы (рис. 15.2), переключение метаболизма гликогена от фосфоролиза к синтезу достигается только ценой затраты энергии. Путь

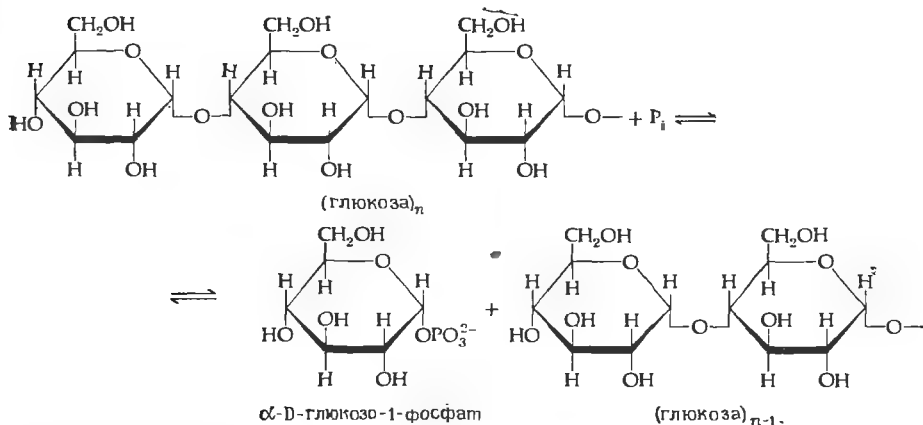


требует затраты двух высокоэнергетических фосфатных связей на образуемую гликозидную связь. Таким образом, чистый выход процесса $\text{глюкоза} \longrightarrow \text{гликоген} \longrightarrow \text{лактат}$ составляет только одну молекулу АТР на глюкозный эквивалент. Однако расход АТР для синтеза гликогена совершается в покоящейся мышце, когда O_2 имеет-

ся в достаточном количестве, вследствие чего становится возможным депонирование гликогена, этого быстро мобилизуемого резерва энергии; выход же трех АТФ на глюкозный эквивалент происходит при анаэробном сокращении, когда гликоген потребляется.

15.3.2. Фосфоролиз гликогена

Реакция, при помощи которой становится доступной глюкоза гликогена, катализируется *гликоген-фосфорилазой* и представляет собой фосфоролиз с образованием глюкозо-1-фосфата:



Константа равновесия для этой реакции может быть рассчитана из уравнения

$$K_{eq} = \frac{[(C_6H_{10}O_5)_{n+1}] [P_i]}{[(C_6H_{10}O_5)_n] [\text{глюкозо-1-фосфат}]}$$

Каждая молекула полисахарида является и реагирующим веществом, и продуктом; поэтому K_{eq} определяется отношением [орто-фосфат]/[глюкозо-1-фосфат], и реакция лишь слегка смещена в сторону синтеза гликогена. Поскольку глюкозо-1-фосфат — более сильная кислота, чем $H_2PO_4^-$, величина этого отношения зависит от pH, приближаясь к 3 при pH 7. Малая ΔG° для этой реакции согласуется с тем фактом, что ΔG° для гидролиза глюкозо-1-фосфата (—4800 кал/моль) лишь немного отличается от таковой для гидролиза мальтозидной связи (—4200 кал/моль).

Фосфорилаза атакует молекулу гликогена с конца каждой цепи, отщепляя последовательные глюкозные остатки в виде глюкозо-1-фосфата до тех пор, пока на каждом ответвлении цепи перед точкой ветвления остается четыре остатка глюкозы (рис. 15.3).

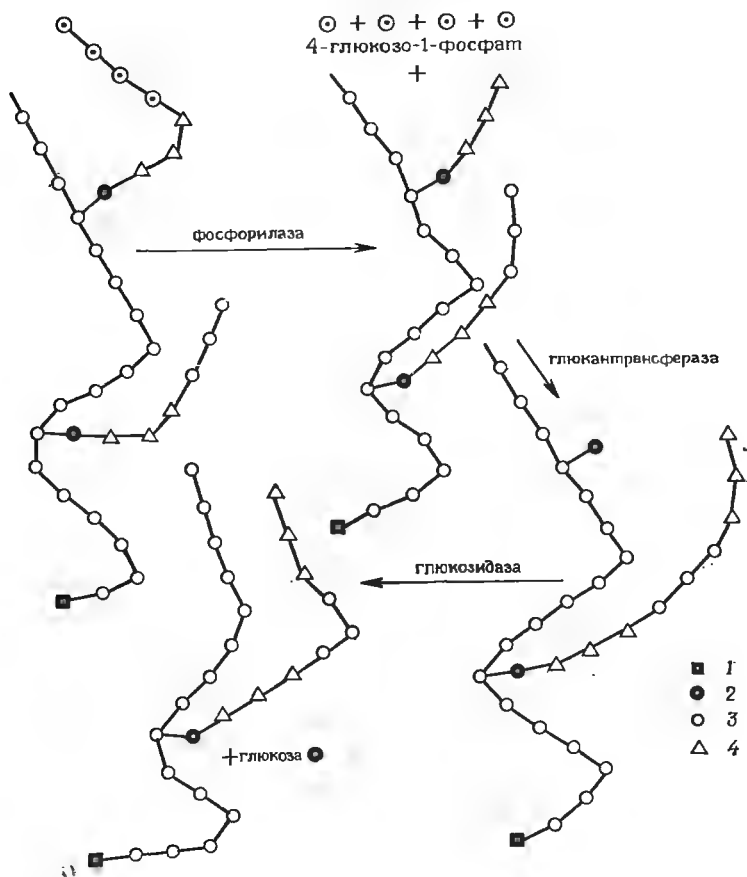


Рис. 15.3. Деградация гликогена в клетке. Фосфорилаза оперирует на всех доступных ветвях гликогена, в результате чего образуется остаточный декстрин; на этой схеме показано превращение для одной ветви цепи А. 1 — терминальная глюкоза с потенциально редуцирующей группой; 2 — глюкоза в точке ветвления присоединена к главной цепи 1,6-связью; 3 — остатки глюкозы, подвергшиеся отщеплению в форме глюкозо-1-фосфата, при участии фосфорилазы; 4 — триглюкозные единицы, присоединенные к глюкозе в точке ветвления.

Тогда действие фосфорилазы прекращается. Второй фермент, *олиго-(α -1,4 $\rightarrow$ α -1,4)-глюкантрансфераза*, после этого переносит трисахарид, который был связан с остатком глюкозы, присоединенным 1,6-связью к главной цепи, на другой участок полисахаридной цепи, соответственно увеличивая ее длину и оставляя единственный остаток глюкозы в точке ветвления. Гидролитическое отщепление глюкозы из 1,6-связи в точке ветвления дает возмож-

ность для продолжения фосфоролиза до момента достижения следующей точки ветвления. Фермент мышцы кролика состоит из единственного полипептида (мол. масса $\sim 160\,000$) и, по-видимому, имеет два различных каталитических центра, один из которых катализирует перенос трисахарида, а другой — гидролитическое отщепление α -1,6-связанного глюкозного остатка в точке ветвления. Таким образом, единственный фермент, часто называемый ферментом, *расщепляющим связи ветвления*, фактически удаляет разветвленные цепи гликогена, но осуществляет это в два различных этапа.

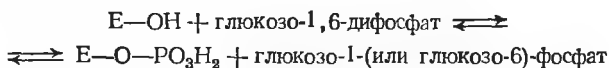
15.3.3. Фосфоглюкомутаза

Глюкозо-1-фосфат, образующийся в результате действия фосфорилазы, направляется в гликолитический путь после воздействия *фосфоглюкомутазы*, которая катализирует реакцию



В равновесной смеси соотношение 6- и 1-фосфатов составляет 94 : 6. Это согласуется с тем фактом, что ΔG° для гидролиза 1-фосфата выше, чем для гидролиза 6-фосфата. 1-Фосфат также более лабилен в кислом растворе.

Фосфоглюкомутаза (мол. масса 62 000) из различных источников, в том числе из мышц млекопитающих и рыб, дрожжей, высших растений и многих бактерий, очень схожи; фермент из мышцы кролика состоит из двух неидентичных субъединиц. Реакция осуществляется только в присутствии *глюкозо-1,6-дифосфата* и Mg^{2+} . После добавления ^{32}P -меченой формы любого из упомянутых трех эфиров глюкозы быстро устанавливается равновесное распределение изотопа между всеми тремя компонентами. Инкубация фермента из различных источников с ^{32}P -меченым глюкозо-1,6-дифосфатом приводит к получению меченого фермента, из которого путем ферментативного гидролиза выделяют пептид — $\text{Thr—Ala—Ser—}^{32}\text{P—His—Asp}$. Эти наблюдения позволяют предположить, что реакция протекает следующим образом:



В ходе повторных циклов указанной реакции может происходить полное превращение одного моноэфира в другой. Так, если молекула глюкозо-6-фосфата реагирует с фермент-фосфатным комплексом, она этерифицируется в положении 1; образовавшийся в результате дифосфат реагирует с незтерифицированной формой фер-

мента, передавая 6-фосфатную группу; в результате накапливается глюкозо-1-фосфат.

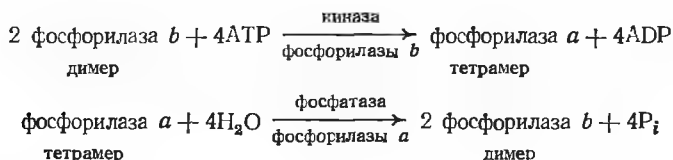
Постоянный источник глюкозо-1,6-дифосфата обеспечивается благодаря действию *фосфоглюкокиназы*, которая катализирует реакцию



Фосфоглюкомутаза способна катализировать мутазные реакции, хотя и более медленно, с различными другими гексозофосфатами (табл. 9.2).

15.3.4. Гликоген-фосфорилаза

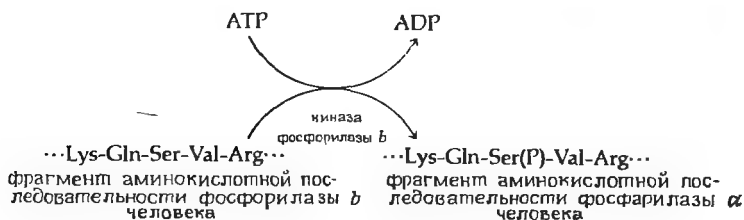
Этот фермент, составляющий ~5% всех растворимых мышечных белков, состоит из идентичных субъединиц — полипептидных цепей с мол. массой по ~100 000 и может находиться в форме димеров и тетрамеров. Димерные и тетрамерные формы, обозначаемые соответственно как фосфорилаза *b* и фосфорилаза *a*, могут взаимопревращаться в ходе следующих ферментных реакций:



Фосфорилаза *b*, по существу, неактивна в отсутствие положительных эффекторов; ее активность строго регулируется аллостерическими механизмами (разд. 8.7.1), в то время как полная активность фосфорилазы *a* проявляется в отсутствие тех соединений, которые служат эффекторами фосфорилазы *b*.

У этих двух форм фосфорилазы обнаруживаются несколько различных «центров». Во-первых, обе имеют каталитические центры, где осуществляется взаимодействие гликогена, глюкозо-1-фосфата и P_i . Во-вторых, у фосфорилазы *b* имеются нуклеотидсвязывающие центры для АМР, который связывается гомотропно; это означает, что связывание одного АМР облегчает связывание другого в других связывающих АМР центрах. Фосфорилаза *a* также способна связывать АМР, но это мало влияет на ее активность. Связывание АМР с фосфорилазой *b* вызывает изменение конформации, которое усиливает ее ферментативную активность путем резкого снижения K_m для гликогена, глюкозо-1-фосфата и P_i . Очевидно, АМР — положительный эффектор для фосфорилазы *b*, а АТР, конкурирующий с АМР за одно и то же место связыва-

ния, — отрицательный эффектор в том смысле, что, будучи связанным в нуклеотидсвязывающем центре, он не способен вызывать то изменение конформации, которое усиливает активность. В-третьих, в другом (отчетливо выраженном) центре в результате связывания глюкозо-6-фосфата частично преодолевается вызванная АМР активация фосфорилазы *b*, что, возможно, объясняется отделением АМР. В-четвертых, внутри каждой субъединицы обеих форм 1 моль пиридоксальфосфата (разд. 20.3.2) связан в шиффовом основании с ϵ -аминогруппой лизинового остатка. Пиридоксальфосфат может обратимо отщепляться от нативного фермента при условиях мягкой денатурации; полученный в результате белок лишен активности. Предшествующее восстановление боргидридом стабилизирует связь пиридоксальфосфата с ферментом, но с небольшой потерей активности. Отсюда следует, что в этом случае фосфопиридоксаль играет только структурную роль. В-пятых, в каждой субъединице фосфорилазы *b* специфический остаток серина в полипептидной последовательности фосфорилируется АТР в присутствии киназы фосфорилазы *b*, что осуществляется следующим образом:



Активность существующей в форме тетрамера фосфорилазы *a* не зависит от АМР, фермент не подавляется ни АТР, ни глюкозо-6-фосфатом и имеет значения K_m для гликогена, глюкозо-1-фосфата и P_i того же порядка, что и у АМР-активированной формы фосфорилазы *b*. Вероятность того, что стимулирующие активность изменения конформации, наступающие в результате связывания АМР с фосфорилазой *b* или же в результате фосфорилирования фермента, весьма близки по характеру, доказываются тем фактом, что в обоих случаях в каждой субъединице две слабореагирующие сульфгидрильные группы становятся вообще недоступными для *n*-хлормеркурибензоата.

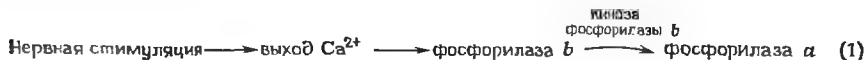
Обычно вся фосфорилаза в покоящейся мышце представляет собой фосфорилазу *b*, в то время как у мышцы, которая уже совершила сокращение в течение некоторого времени, присутствует фосфорилаза *a*. В мышце, получающей прерывистые стимулы, содержание фосфорилазы характеризуется непостоянным соотношением между этими двумя экстремальными формами.

Хотя $[P_i]$ и $[AMP]$ в покоейшей скелетной мышце достаточны для того, чтобы происходил гликогенолиз фосфорилазой b , $[ATP]$ и $[глюкозо-6-фосфата]$ таковы, что они противодействуют активирующему эффекту AMP . Вместе с тем фосфорилаза b не способна участвовать в синтезе гликогена путем простого обращения реакции, поскольку $[глюкозо-1-фосфата] = 10$ мкмоль/л, в то время как для глюкозо-1-фосфата $K_m \approx 10$ ммоль/л. Когда мышца сокращается, концентрации ATP и глюкозо-6-фосфата быстро уменьшаются и концентрация AMP возрастает, т. е. создаются условия, которые позволяют проявление активности фосфорилазы b . Действительно, у мышей I-штамма, недостаточных по киназе фосфорилазы b ($\sim 0,3\%$ нормы) и вследствие этого обладающих лишь ограниченной способностью превращать фосфорилазу b в фосфорилазу a , не наблюдается истощения мышечного гликогена при мышечной нагрузке. Однако почти взрывоподобное увеличение скорости гликогенолиза спустя несколько минут после мышечного сокращения становится возможным у нормальных животных путем превращения фосфорилазы b в фосфорилазу a при участии киназы фосфорилазы b .

15.3.5. Киназа фосфорилазы b

Фермент скелетной мышцы (мол. масса $1,33 \cdot 10^6$) содержит три различные субъединицы: А, В и С (мол. масса 118 000, 108 000 и 41 000 соответственно). Предполагают, что имеется субъединичная структура $A_4V_4C_8$, но точная роль каждой субъединицы неясна. С-Субъединица, возможно, несет каталитический центр, поскольку переваривание киназы трипсином, приводящее к значительной деградации субъединиц А и В, не сопровождается утратой ферментативной активности.

Киназа фосфорилазы b регулируется двумя основными механизмами. В покоейшей мышце $[Ca^{2+}]$ очень низка, и киназа, имеющая абсолютную потребность в Ca^{2+} ($K_m^{Ca^{2+}} = 0,2$ мкмоль/л), практически неактивна. В ответ на нервный импульс, приводящий к сокращению мышцы и гликогенолизу, Ca^{2+} выходит из саркоплазматической сети (гл. 36) в саркоплазму, где в результате создается $[Ca^{2+}] = 0,3—20$ мкмоль/л; это равносильно сигналу киназе для превращения фосфорилазы b в фосфорилазу a , сигналу к инициации гликогенолиза, как это представлено в следующих реакциях:



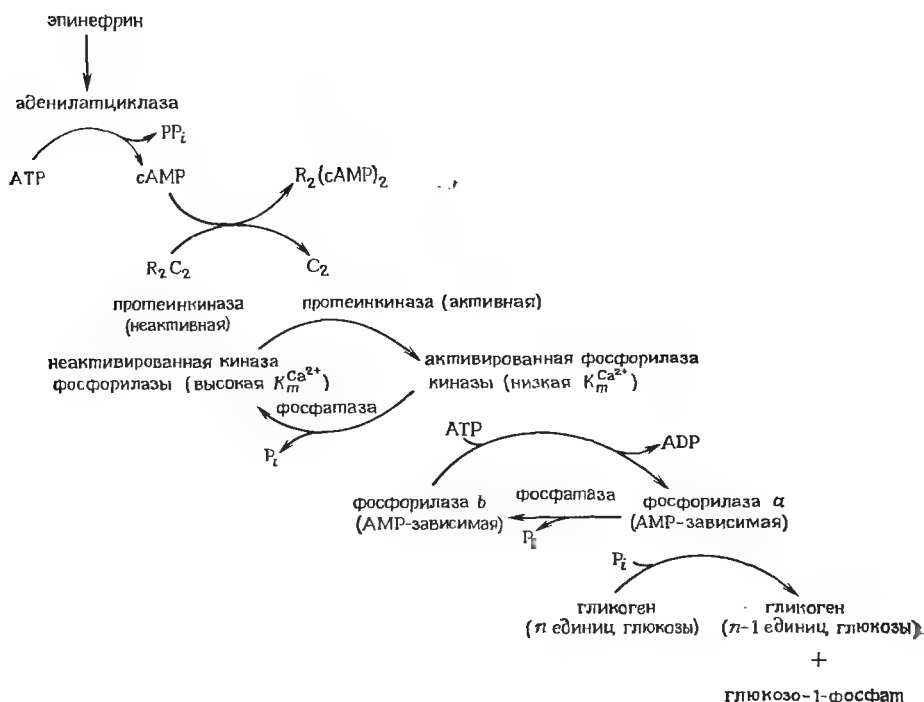
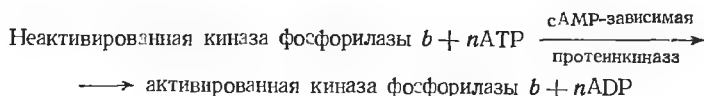


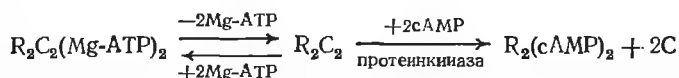
Рис. 15.4. Схематическое изображение цикла активации и дезактивации гликоген-фосфорилазы в скелетной мышце. На каждом более низком уровне цикла активации число участвующих молекул возрастает по крайней мере на один порядок.

Второй регуляторный механизм заключается в активации киназы фосфорилазы *b* под действием сАМР-зависимой протеинкиназы (разд. 11.2.1).



$K_m^{\text{Ca}^{2+}}$ фосфорилированной активной киназы ниже, чем нефосфорилированной формы. Адреналин активирует аденилатциклазу (разд. 10.3), что приводит к образованию сАМР, который активирует протеинкиназу; последняя в свою очередь активирует киназу фосфорилазы *b*, «запуская» тем самым гликогенолиз (рис. 15.4). Гликоген также является мощным активатором киназы фосфорилазы *b* и может способствовать регуляции активности (см. ниже).

Протеинкиназа, которая содержит регуляторную (R) и каталитическую (C) субъединицы (гл. 8), активируется сАМР, причем комплекс Mg-АТР влияет на эту активацию. Показано, что Mg-АТР, один из субстратов для С-субъединиц, связывается с активным центром этих субъединиц во время фосфорилирования киназы фосфорилазы *b*. Вместе с тем Mg-АТР связывается еще более прочно с неактивной протеинкиназой R_2C_2 , чем с С-субъединицами, и поэтому комплекс $R_2C_2-(Mg-АТР)_2$ должен подвергнуться диссоциации для того, чтобы сАМР мог связываться с регуляторной субъединицей R и произошла бы активация фермента; очевидно, процесс активации протеинкиназы включает следующие реакции:



Высокое сродство Mg-АТР к R_2C_2 имеет значение для предотвращения активации протеинкиназы в результате связывания Mg-АТР с С-субъединицами. Более того, концентрация R_2C_2 в мышце приблизительно равна обычной [сАМР], в результате чего кажущаяся K_a для активации киназы за счет сАМР оказывается на самом деле более высокой, чем измеряемая *in vitro*.

сАМР-Зависимая протеинкиназа быстро фосфорилирует В-субъединицу киназы фосфорилазы *b* и несколько медленнее — субъединицу А. Именно благодаря фосфорилированию субъединицы В увеличивается активность киназы фосфорилазы *b*; последующее фосфорилирование субъединицы А трансформирует фермент в такую форму, в которой фосфорилированная субъединица В становится эффективным субстратом для фосфатазы киназы фосфорилазы (см. ниже). В самом деле, полностью фосфорилированный фермент инактивируется под действием фосфатазы в 100 раз быстрее, нежели частично фосфорилированная форма.

15.3.6. Фосфатазы в гликогенолизе

Как показано на рис. 15.4, дефосфорилирование фосфорилазы *a* и активированной киназы фосфорилазы *b* составляет один из главных механизмов регуляции гликогенолиза. Из скелетной мышцы в очищенной форме были изолированы две фосфатазы, называемые *фосфопротеидфосфатаза* I и II (мол. масса 30 500 и 34 000 соответственно); оба фермента могут дефосфорилировать как фосфорилазу *a*, так и гликоген-синтазу D (см. ниже). Эти ферменты представляют собой фосфатазы фосфопротеидов довольно широкой специфичности, поскольку к субстратам их действия относятся фосфоказеин, фосфогистон и фосфо-TN-I-субъединица тропони-

на (гл. 36). Значения K_m для фосфогистона и фосфоказеина в 3—15 раз превышают значения K_m для фосфоферментов мышцы. Мало известно относительно регуляции активности этих ферментов. Однако показано, что дефосфорилирование фосфорилазы *a*, частично очищенной фосфатазой, ингибируется глюкозо-1-фосфатом, P_i и АМР и стимулируется глюкозо-6-фосфатом и глюкозой. Механизм активации или ингибирования под влиянием этих эф-фекторов неясен. Еще одна фосфопротеидфосфатаза, которая дей-ствует на киназу фосфорилазы *b* и гликоген-синтазу D (см. ниже), ингибируется гликогеном, когда субстратом служит киназа. Ионы металлов также требуются для дефосфорилирования киназы, со-державшей только фосфо-В-субъединицы (см. выше), но не нужны для дефосфорилирования киназы, содержащей обе фосфорилиро-ванные субъединицы А и В.

15.3.7. Процесс расщепления связей в местах ветвления; продуцирование глюкозы

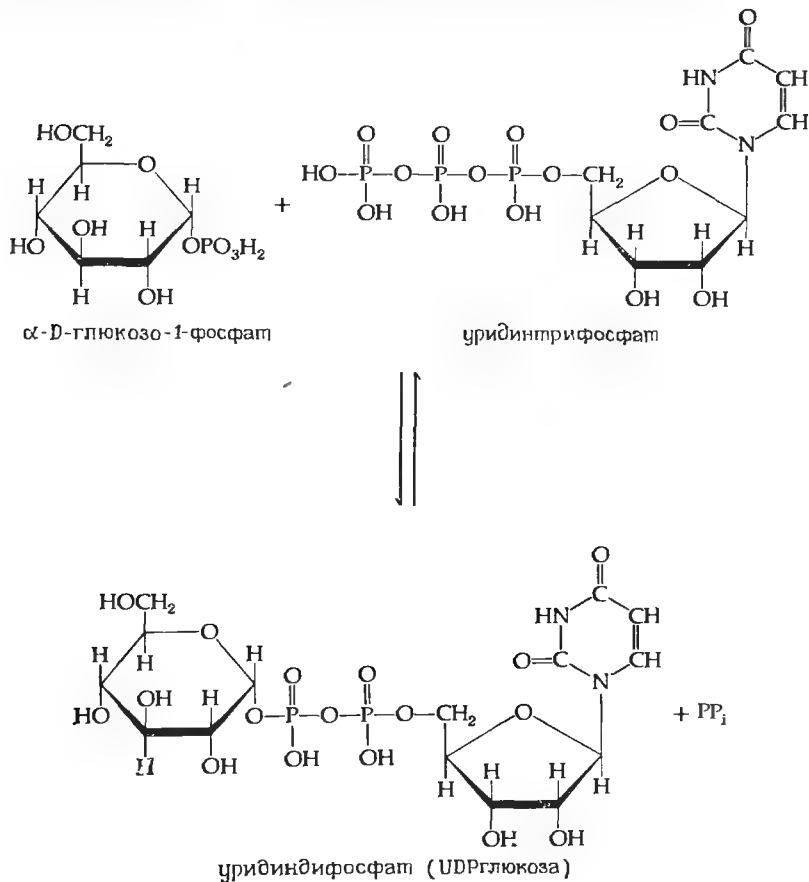
Благодаря объединенному действию активированной фосфори-лазы и фермента, расщепляющего связи в местах ветвления (рис. 15.3), происходит деградация гликогена до глюкозо-1-фос-фата и свободной глюкозы (выход последней $\sim 8\%$). Фермент, расщепляющий связи в местах ветвления, в меньших количествах присутствует в скелетной мышце, нежели другие ферменты систе-мы гликогенолиза, и может оказаться лимитирующим скорость компонентом. Этот фермент (мол. масса 114 000), состоящий из двух типов субъединиц и наиболее активный при $pH \sim 4$, в боль-ших количествах содержится в лизосомах.

По мере исчезновения эпинефрина из мышцы скорость фосфо-ролиза гликогена замедляется и процесс останавливается. Дейст-вие аденилатциклазы тогда прекращается, сАМР гидролизуется при участии фосфодиэстеразы, и вслед за отщеплением фосфата от активированной формы киназы фосфорилазы под действием фос-фопротеидфосфатазы наступает активное поглощение Ca^{2+} вези-кулами саркоплазматической сети. Если клетка не испытывает не-достатка АТР, то происходит накопление глюкозо-6-фосфата, а затем глюкозо-1-фосфата; последний используется в синтезе UDPглюкозы (см. ниже).

15.3.8. Синтез гликогена в скелетной мышце

Непосредственным предшественником в синтезе гликогена яв-ляется уридиндифосфатглюкоза, образующаяся благодаря дейст-вию уридиндифосфатглюкозопирофосфорилазы, как показано ни-же. Представленная схема, объясняющая механизм реакции, при-

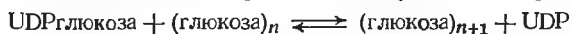
годна и для описания обращения процесса синтеза; однако такое обращение процесса не имеет биологического значения.



PP_i происходит из терминального пирозфосфата молекулы уридинтрифосфата. Поскольку одна пирозфосфатная связь разрывается и заменяется новой пирозфосфатной связью, реакция должна быть свободно обратимой. Однако происходящее в физиологических условиях гидролитическое расщепление PP_i пирозфосфатазой (разд. 10.3) фактически приводит к необратимому синтезу UDPглюкозы. Необходимый для этого процесса глюкозо-1-фосфат образуется из глюкозо-6-фосфата в ходе фосфоглюкомутазной реакции. Специфические контрольные механизмы для фермента млекопитающих, представляющего собой октамер из единиц с молекулярной массой ~50 000, неизвестны.

15.3.8.1. Гликоген-синтаза

Синтез цепи амилозного типа в гликогене при участии гликоген-синтазы может быть изображен следующим образом:



Изменение свободной энергии на глюкозный эквивалент в этой реакции составляет около -3200 кал/моль; равновесие поэтому сдвинуто в сторону синтеза гликогена, который происходит в 250 раз быстрее, чем обратный процесс. Фермент не способен синтезировать гликоген непосредственно из UDPглюкозы; глюкозная единица последней должна быть перенесена на предсуществующую акцепторную полиглюкозную цепь, а именно на гликоген. Однако амилоза, амилопектин или даже глюкоза могут также служить акцепторами, но при столь высоких концентрациях ($K_m^{\text{глюкоза}} = 1$ мол/л), что эти сахара не могут иметь физиологического значения. В этом смысле фермент животных отличается от гликоген-синтазы из *E. coli*, которая легко утилизирует в качестве акцепторов олигосахариды, даже такие небольшие, как мальтоза. Происхождение молекул гликогена все же представляется неясным, если учесть слабую акцепторную способность глюкозы и олигосахаридов, в которых остатки глюкозы соединены α -1,4-гликозидной связью. Предполагается, что гликоген представляет собой гликопротеид, который содержит $<1\%$ белка по массе, и что образуемая в долинхлорфосфатзависимом процессе (разд. 15.8.3) полиглюкозная цепь встраивается в белок. Действительно, инкубация микросом печени с UDPглюкозой и долинхлорфосфатом сопровождается значительным включением глюкозы в эндогенные акцепторы неизвестной структуры и функции. Более того, изолированный и очищенный гликоген никогда не бывает совершенно свободным от следов белка.

Плотноупакованная разветвленная структура, характерная для гликогена, есть результат действия *амило-(1,4 $\rightarrow$ 1,6)-трансгликозилазы*. В печени, мышце и мозге этот *гликоген-ветвящий фермент* (отличный от описанного ранее фермента, *расщепляющего связи в местах ветвления*) отщепляет с растущих В-цепей фрагменты из шести или семи глюкозных единиц, соединенных α -1,4-связью (рис. 15.1), и переносит их на 8—12 единиц дальше с образованием α -1,6-связи (рис. 15.5). Именно специфичностью этого фермента определяется плотная упаковка ветвей гликогена, как это выясняется при сравнении с действием ферментов, ответственных за ветвление при синтезе амилопектина в растениях.

Две взаимопревращающиеся формы гликоген-синтазы отличаются по потребности в глюкозо-6-фосфате как эффекторе. Гликоген-синтаза I (независимая от глюкозо-6-фосфата) и гликоген-синтаза D (зависимая от глюкозо-6-фосфата) представляют собой

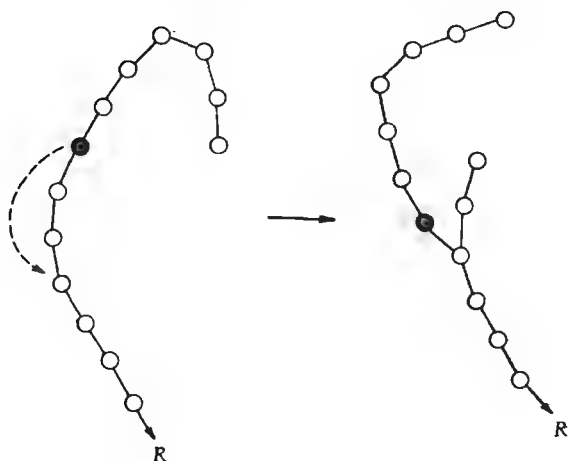
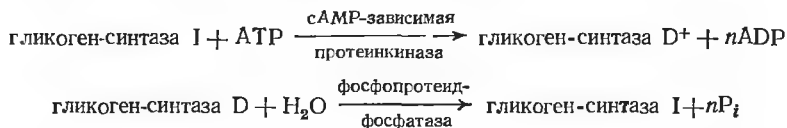


Рис. 15.5. Действие амило-(1,4→1,6)-трансгликозилазы. R — главная часть молекулы гликогена; каждый кружок соответствует глюкозной единице. Темные кружки означают глюкозную молекулу, альдегидный углерод которой перенесен от 1,4-связи к 1,6-связи.

нефосфорилированную и фосфорилированную формы синтазы соответственно. Взаимопревращение этих двух форм осуществляется непосредственно той же самой сАМР-зависимой протеинкиназой, которая также превращает неактивную киназу фосфорилазы *b* в активную киназу фосфорилазы *b* (разд. 15.3.4), и фосфопроteid-фосфатазой, которая также действует на фосфорилазу *a* (разд. 15.3.4). Реакции взаимопревращения таковы:



Точное количество включаемого фосфата не установлено, но, вероятно, может достигать шести фосфатных групп на молекулу синтазы. Следует отметить, что один или более остатков серина из числа подвергшихся фосфорилированию находятся в той же аминокислотной последовательности, как у гликоген-фосфорилазы (разд. 15.3.4).

Эти взаимоотношения схематически иллюстрируются схемой, приведенной на рис. 15.6, где отчетливо видно, что киназы путей гликогенолиза и синтеза гликогена находятся под контролем единственного эффектора — сАМР.

Синтаза скелетной мышцы — тетрамер из субъединиц с молекулярной массой до $\sim 85\,000$. Аналогично гликоген-синтазам из других источников этот фермент тесно связан с частицами гликогена. Подобно гликоген-фосфорилазе, синтаза контролируется как аллостерически, так и путем фосфорилирования, но последствия фосфорилирования для активности обратны тем, которые наблюдаются для фосфорилазы. В покоящейся мышце фермент находится в нефосфорилированной, активной форме; в сокращающейся мышце фермент фосфорилирован и почти неактивен. В присутствии достаточно высокой концентрации глюкозо-6-фосфата фосфорилированная форма проявляет почти полную активность.

Активация синтазы D глюкозо-6-фосфатом приводит к значительному снижению K_m для обоих субстратов этого фермента. Степень активации глюкозо-6-фосфатом, однако, значительно варьирует в зависимости от степени фосфорилирования синтазы, как показано для фермента мышцы кролика на рис. 15.7. Так, при низких концентрациях глюкозо-6-фосфата высокофосфорилированные формы фермента практически неактивны, в то время как при этих же концентрациях отмечается выраженная активация

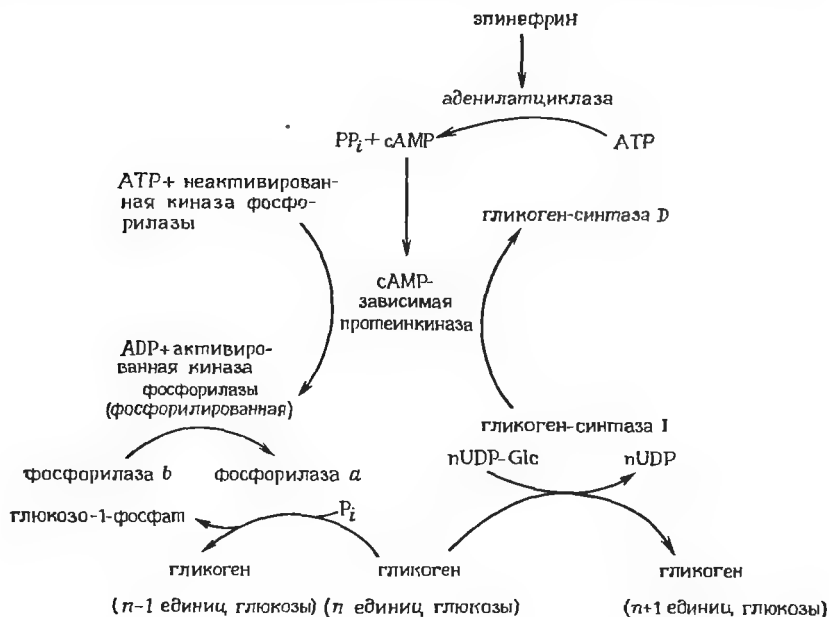
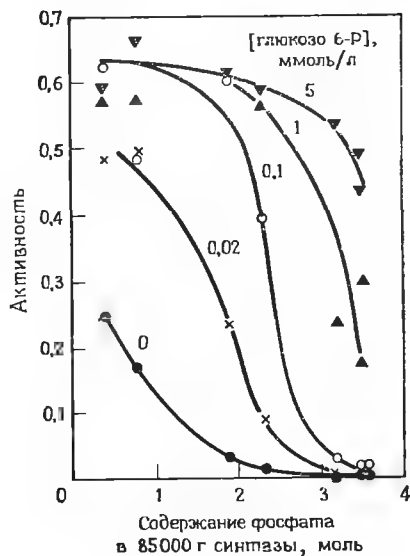


Рис. 15.6. Схема ряда сопряженных реакций в скелетной мышце, свидетельствующих о существовании взаимной зависимости в регуляции гликогенолиза и синтеза гликогена при стимуляции аденилатциклазы эпинефрином.

Рис. 15.7. Активность гликоген-синтазы как функция степени фосфорилирования синтазы и концентрации глюкозо-6-фосфата. Активность измеряли при постоянной $[\text{UDPглюкоза}] = 0,2 \text{ ммоль/л}$; $[\text{глюкозо-6-фосфат}]$ варьировалась, как показано на рисунке (0—5 ммоль/л). [Roach P. J., Larner J., J. Biol. Chem., 251, 1921, 1976.]

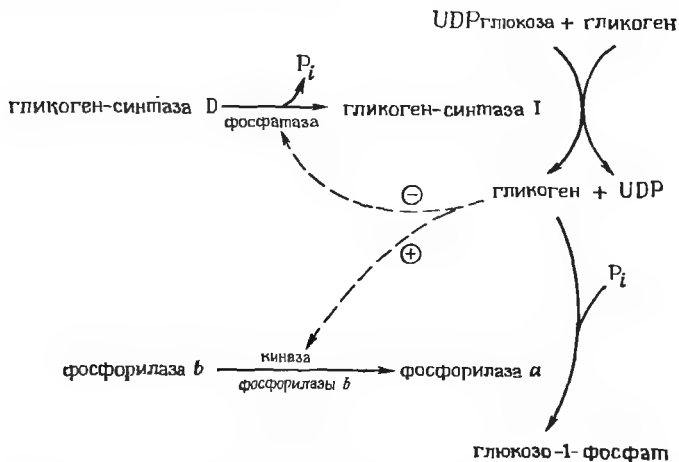


синтеза гликогена после дефосфорилирования синтазы D. АТФ, ADP, AMP, UDP и P_i ингибируют синтазу и способствуют регуляции ее активности, но эффективность этих ингибиторов также колеблется в зависимости от степени фосфорилирования фермента; так, все они становятся более сильными ингибиторами при увеличении степени фосфорилирования. На рис. 15.8 схематически представлены эффекты активаторов и ингибиторов в виде функции от степени фосфорилирования гликоген-синтазы.

Совершенно очевидно, что фосфорилирование гликоген-синтазы и фосфорилазы совершается при одних условиях, дефосфорилирование — при других, и притом в каждом случае с противоположным эффектом. Синтаза более активна в своей дефосфо-форме, в то время как фосфо-форма может быть активирована аллостерически глюкозо-6-фосфатом; фосфорилаза активна в фосфо-форме, в то время как дефосфо-фермент может аллостерически активироваться AMP.

Имеющиеся данные показывают, что фосфатазы, дефосфорилирующие гликоген-синтазу D, — это те же ферменты, которые дефосфорилируют киназу фосфорилазы *b* (разд. 15.3.5). Однако фосфатаза (ы) гликогенсинтазы D, по-видимому, подавляется гликогеном, поскольку существует обратная зависимость между концентрацией гликогена в мышце и процентом синтазы в форме I. Гликоген, кроме того, сильный активатор киназы фосфорилазы *b* (разд. 15.3.5), что свидетельствует об участии гликогена, как та-

жового, в регуляции своего собственного синтеза и расщепления (см. приведенную ниже схему).



Таким образом, когда снижается концентрация гликогена в мышце, синтез гликогена стимулируется путем снятия ингибирования с превращения D-формы синтазы в I-форму и путем ослабления активации киназы фосфорилазы *b*. Когда уровень гликогена возрастает, вступают в силу обратные взаимоотношения. Возможно, что эти взаимоотношения следует связать с наблюдением о прекращении синтеза гликогена при повышении его концентрации выше, чем это бы соответствовало 1%-ному раствору, т. е. именно той концентрации, которая найдена в хорошо упитанной, покоящейся мышце. При наличии некоторой активности киназы фосфорилазы *b* повторное фосфорилирование гликоген-синтазы D должно способствовать прекращению дальнейшего синтеза гликогена, поскольку в присутствии значительных концентраций глюкозо-6-фосфата и АТР, и P_i (при тех концентрациях, в которых они найдены в покоящейся мышце) представляют собой выраженные ингибиторы синтазы D.

Под влиянием адреналина в мышце, следовательно, происходят активация фосфорилазы гликогена и прекращение синтеза гликогена (рис. 15.6), причем в обоих случаях это достигается активацией аденилатциклазы и связанной с этим активацией протеинкиназы. Последовательность, приводящая к инактивации синтазы, содержит на одно звено меньше, чем последовательность, приводящая к активации фосфорилазы. Этого, однако, достаточно, потому что нет соответствующей необходимости в усилении сигнала в системе синтеза; максимальная скорость синтеза гликогена в мышце не может превышать 0,3% самой высокой скорости фос-

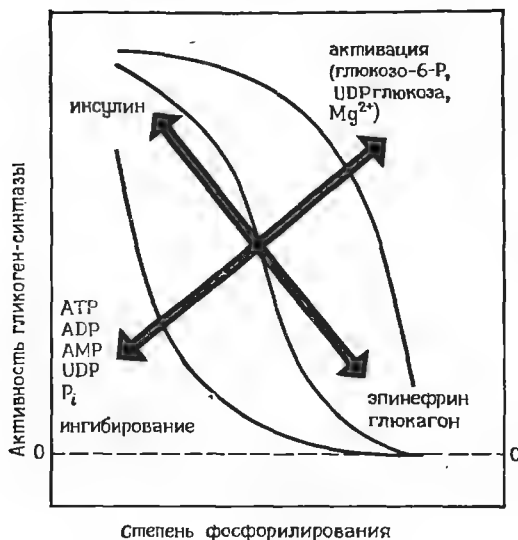


Рис. 15.8. Активность гликоген-синтазы как функция степени фосфорилирования синтазы и концентрации низкомолекулярных эффекторов. Низкомолекулярные эффекторы стимулируют или ингибируют активность синтазы и могут быть причиной изменения расположения кривых активность — степень фосфорилирования. Стрелки указывают сдвиги в кривых активность — степень фосфорилирования, обусловленные низкомолекулярными эффекторами и гормонами (инсулином, эпинефрином и глюкагоном). [Roach P. J., Larner J., J. Biol. Chem., 251, 1924, 1976.]

форолиза гликогена. Тот факт, что одна и та же сАМР-зависимая протеинкиназа и фосфатаза(ы) участвуют в фосфорилировании и дефосфорилировании как гликоген-фосфорилазы, так и синтазы, свидетельствует о координации этих процессов в клетке. $V_{\max}$ для фосфатазы фосфорилированной формы гликоген-фосфорилазы в 100 раз превышает $V_{\max}$, если субстратом служит гликоген-синтаза, что также свидетельствует о возможности резкого выключения фосфорилазы; включение синтазы — процесс более медленный, но синтез инициируется с момента начала аккумуляции глюкозо-6-фосфата.

15.4. Метаболизм гликогена в печени

Пути гликогенолиза и синтеза гликогена в печени, по-видимому, подобны таковым в мышце (рис. 15.2 и 15.4); любая из ферментных активностей, связанных с метаболизмом гликогена в мышце, обнаружена в печени. Однако имеются существенные раз-

личия в структуре печеночных и мышечных ферментов и в механизмах регуляции их активности в метаболизме гликогена. Кроме того, печень в отличие от мышцы в норме синтезирует гликоген из лактата крови и гидролизует глюкозо-6-фосфат до глюкозы; это два самых важных процесса, связанных с ролью печени в регуляции углеводного обмена у интактного животного.

Печеночные фосфорилазы *a* и *b* взаимопревращаются под действием киназы фосфорилазы *b* и фосфатазы фосфорилазы *a*. Фосфорилаза *b* по размеру (мол. масса 185 000) подобна мышечному ферменту, но отличается от него по структуре, о чем свидетельствует слабая иммунологическая перекрестная активность между ферментами мышц и печени из одного и того же вида животных. Это согласуется с тем фактом, что наследственные дефекты печеночной фосфорилазы не проявляются на ферменте мышц и напротив; этот вопрос обсуждается ниже (табл. 15.3). АМР — положительный эффектор печеночной фосфорилазы *b*, а глюкоза — отрицательный эффектор; последняя проявляет свое действие путем снижения сродства фермента к глюкозо-1-фосфату и увеличения кооперативности между центрами связывания глюкозо-1-фосфата. Фосфорилаза *b* печени активна *in vitro* в отсутствие эффекторов, но нуждается в сАМР для проявления полной активности. Печень почти свободно проницаема для глюкозы, которая, согласно имеющимся предположениям, связывает фосфорилазу *a* и способствует ее превращению в фосфорилазу *b*, благодаря чему создается важный регуляторный механизм (рис. 15.9).

Киназа печеночной фосфорилазы *b* в неочищенных экстрактах печени активируется сАМР-зависимой протенинкиназой. Однако высокоочищенная киназа фосфорилазы *b* (мол. масса 35 000) не активируется при инкубации с сАМР, протенинкиназой и Mg-АТР. Ее активность стимулируется гликогеном, причем степень активации отчасти зависит от присутствия Ca^{2+} .

Существует множество форм печеночных фосфатаз, которые дефосфорилируют и фосфорилазу *a*, и активированную киназу фосфорилазы *b* точно так же, как это имеет место в мышце (рис. 15.4). По крайней мере одна из печеночных форм ингибируется гликогеном и АМР и стимулируется глюкозой.

Природа и поведение ферментов, участвующих в печеночном гликогенолизе, позволяют предположить, что регуляция гликогенфосфорилазы в печени несколько отличается от таковой в скелетной мышце. Основанием для такой точки зрения послужили исследования на интактных крысах и на изолированных клетках печени крысы, показавшие, что стимуляция гликогенолиза и активация фосфорилазы адреналином не сопровождаются увеличением общей клеточной концентрации сАМР и активацией сАМР-зависимой протенинкиназы. Однако стимуляция гликогенолиза глюкозой

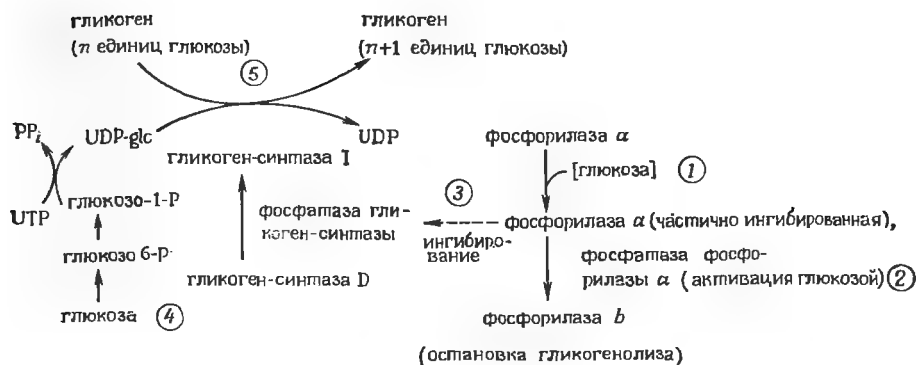


Рис. 15.9. Предполагаемый механизм для стимуляции синтеза гликогена в печени при высоких концентрациях глюкозы. Глюкоза связывает фосфорилазу α (1) и активирует фосфатазу фосфорилазы α (2), что приводит к образованию фосфорилазы b и остановке гликогенолиза. Когда уровни фосфорилазы α снижаются, снижается ингибирование фосфатазы гликоген-синтазы (3) и синтез гликогена из глюкозы (4) возрастает благодаря повышению содержания гликоген-синтазы I (5). [Hers H. G., Annu. Rev. Biochem., 45, 180, 1976.]

ном (гл. 46) происходит через сАМР-зависимые активаторы фосфорилазы, напоминая в этом отношении процесс активации гликогенолиза в мышце.

В синтезе гликогена в печени, очевидно, участвуют ферменты, не отличающиеся по характеру активности от ферментов скелетной мышцы. В опытах *in vitro* показано, что две формы (I и D) гликоген-синтазы могут взаимопревращаться под действием сАМР-зависимой протеинкиназы и фосфопроteidфосфатазы. Гликоген-синтаза D активна только в присутствии глюкозо-6-фосфата, однако P_i при физиологических концентрациях препятствует активации. Цитрат также активирует форму D, но его эффект нивелируется физиологическими концентрациями АТР. Синтазы печени и мышцы структурно не идентичны, хотя и очень близки; это согласуется с наблюдениями о том, что людям с наследственным дефектом печеночной синтазы свойственен нормальный уровень мышечной синтазы (табл. 15.3).

В печени, как и в скелетной мышце, существует взаимная зависимость между механизмами, регулирующими распад и синтез гликогена, хотя природа этих механизмов в мышце и печени неодинакова. Концентрация глюкозы в печени, вероятно, играет ключевую роль в регуляции путем серии реакций (рис. 15.9). Когда концентрация глюкозы в печени увеличивается, глюкоза, вероятно, связывается с фосфорилазой α , частично ингибируя ее и стимулирует фосфатазу фосфорилазы α , что приводит к превращению

фосфорилазы *a* в фосфорилазу *b*. Предполагают также, что фосфорилаза *a* — мощный ингибитор фосфатазы гликоген-синтазы; таким образом, по мере уменьшения концентрации фосфорилазы *a* снимается ингибирование фосфатазы гликоген-синтазы, в результате чего становится возможным образование гликоген-синтазы I. Это находит подтверждение в том факте, что после увеличения концентрации глюкозы в крови экспериментальных животных концентрация фосфорилазы *a* в печени снижается и после короткого лаг-периода возрастает концентрация гликоген-синтазы I. Этот ряд событий приводит к остановке гликогенолиза и стимуляции синтеза гликогена. Противодействовать этим эффектам могла бы внутриклеточная [АМР], но в условиях высокого содержания глюкозы [АМР] не может достигать уровня, требуемого для активации фосфорилазы *b* за счет АМР. Если концентрация глюкозы в печени снижается, тогда вышеуказанные реакции обращаются, начинается гликогенолиз и синтез гликогена подавляется.

Конечная концентрация гликогена, синтезированного в печени, может определяться соотношением факторов ингибирования, количеством имевшегося гликогена, возможностью превращения синтазы D в I и активностью фосфатазы фосфорилазы *a*, измеренной в гомогенатах печени. Во всех тканях взаимная зависимость между синтезирующими и фосфорилирующими системами предотвращает действие бесполезных циклов синтеза гликогена и его деполимеризации, что привело бы к расточительному расходованию АТР.

15.5. Физиологическая роль гликогена

Большие резервы химической энергии в получающих достаточно питания тканях мало влияют на осмотическое давление, поскольку накопление происходит либо в виде нерастворимых в воде липидов, либо в виде труднорастворимых полисахаридов с очень большой молекулярной массой. Запасание больших количеств полисахаридов характерно для растений, в которых, за исключением семян, резервы липидов обычно скудны. У высших животных в форме липидов отлагается главная масса запасаемой энергии, в то время как депонирование полисахаридов происходит лишь в виде относительно небольших количеств гликогена. Хотя гликоген встречается в большинстве тканей, включая клетки жировой ткани, скелетная мышца содержит $\sim 2/3$ всего гликогена тела. Остальная часть в основном представлена гликогеном печени.

В табл. 15.2 представлены топливные ресурсы организма обычного мужчины (масса 70 кг) и тучного мужчины, структура скелета которых подобна (измерения проводились после продолжительного голодания).

Таблица 15.2
Резервы окисляемых метаболитов

Метаболит	Содержание резервов у среднего мужчины (с массой ~70 кг)		Содержание резервов у тучного мужчины
	кг	ккал	ккал
Триацилглицерины	15	141 000	750 000
Белок мышц	6	24 000	30 000
Гликоген мышц	0,12	480	640
Гликоген печени	0,07	280	280
Гликоген внеклеточной жидкости	0,02	80	100

15.5.1. Гликоген тканей

Гликоген всех тканей полидисперсен; мол. масса может колебаться от $2,5 \cdot 10^5$ до 10^6 . Количество легко экстрагируемого гликогена, т. е. извлекаемого холодным раствором трихлоруксусной кислоты, всегда меньше общего количества, которое находят после щелочного гидролиза ткани. Менее легко экстрагируемая фракция присутствует в форме нерастворимых гранул. Наблюдения за введенной ^{14}C -глюкозой показывают, что эта фракция гликогена метаболически активна и подвергается постоянному превращению.

15.5.2. Гликоген печени

У различных видов млекопитающих от 2 до 8% массы печени приходится на долю гликогена. Даже в норме у животного, регулярно получающего питание, происходит непрерывный синтез и распад гликогена, хотя количество гликогена в печени и поддерживается приблизительно постоянным. Печень животного, голодавшего в течение 24 ч, практически лишена гликогена. Кормление гликогенными материалами, например глюкозой, приводит к быстрому восстановлению содержания гликогена в печени.

Способ оценки эффективности других соединений как предшественников глюкозы заключается в том, что животным, голодавшим до практически полного истощения гликогена в печени, дают испытуемое вещество. Любой материал, который при этих условиях вызывает увеличение количества гликогена в печени, рассматривается также как источник глюкозо-6-фосфата; поэтому термины *гликогенной* и *гликогенный*, по существу, синонимы. К гликогенным веществам относятся не только гексозы, но и гликогенные аминокислоты (гл. 23), глицерин, промежуточные про-

дукты гликолиза и сахароспирты, такие, как сорбит и инозит. Эти и многие другие соединения, когда их дают голодающим животным, вызывают некоторое увеличение количества гликогена в печени. В каждом случае испытуемое вещество должно сначала превратиться через глюкозо-6- и глюкозо-1-фосфат в UDP-глюкозу.

15.5.2.1. Факторы, влияющие на количество гликогена в печени

Количество гликогена в печени зависит от количества усвоенной пищи и от состава рациона. У животных, получающих бедные углеводами рационы, обычно находят меньше гликогена, чем у животных на богатых углеводами рационах. Физическая нагрузка снижает количество гликогена в печени.

Содержание гликогена в печени регулируется эндокринной системой. Введение адреналина (гл. 45) или глюкагона хорошо упитанным животным приводит к быстрому исчезновению большей части печеночного гликогена. Оба гормона стимулируют превращение фосфорилазы *b* в фосфорилазу *a*, тем самым делая доступным глюкозо-6-фосфат, который гидролизует, и глюкоза поступает в кровь, результатом чего является *гиперглицемия*. Это можно рассматривать как защитный механизм, который в период стресса обеспечивает мускулатуру обильным питанием в таких количествах, какие только потребуются.

Дефицит инсулина приводит к уменьшению содержания гликогена в печени из-за действия еще недостаточно хорошо понятых механизмов. К числу таких механизмов относятся отсутствие инсулинового стимула для системы гликоген-синтазы, снижение концентрации ацетил-СоА, требуемого для стимуляции ферментов, участвующих в синтезе фосфоенолпирувата при глюкогенезе, уменьшение активности глюकोкиназы и повышенная активность глюкозо-6-фосфатазы. Можно было бы ожидать, что введение избытка инсулина вызовет увеличение количества гликогена в печени, но это не обязательное следствие. В результате инъекции инсулина обычно возрастает мышечный, но не печеночный гликоген. Аденогипофиз (гл. 48) продуцирует одно или больше веществ, которые имеют тенденцию увеличивать содержание печеночного гликогена. Гормоны коры надпочечников (гл. 45), увеличивающие приток глюкозы от неуглеводных предшественников, благоприятствуют накоплению гликогена в печени. Введение избыточных количеств тиреоидного гормона (гл. 42) вызывает мобилизацию и исчезновение гликогена печени.

15.5.3. Гликоген мышцы

Хотя нормальная концентрация гликогена в скелетной мышце млекопитающих, составляющая 0,5—1%, ниже, чем в печени, в

связи с большой массой мышц большая часть гликогена тела находится в этой ткани. В отличие от гликогена печени мышечный гликоген не истощается столь же легко при голодании даже в течение длительного периода. Конвульсии, однако, сопровождаются драматическим падением содержания гликогена в мышце. Введение инсулина обычно увеличивает концентрацию гликогена в мышце, но если доза слишком велика и провоцирует гипогликемические конвульсии, то содержание гликогена в мышце может упасть до очень низких уровней.

Введенный голодающему животному адреналин активирует образование сАМР в мышце, тем самым косвенно стимулируя активность фосфорилазы. Однако в мышце невозможен гидролиз глюкозо-6-фосфата до глюкозы, поскольку отсутствует необходимая для этого процесса фосфатаза. Тогда включается дальнейший метаболизм глюкозофосфата, а именно гликолиз, и первыми легко диффундирующими продуктами будут пировиноградная и молочная кислоты. Быстрый гликогенез из этих веществ совершается в печени. Таким образом, последовательность событий, наступающих вслед за введением адреналина голодающему животному, включает, во-первых, снижение количества гликогена в мышце, во-вторых, увеличение уровня лактата в крови и, в-третьих, возрастание количества гликогена в печени. Сердечная мышца в противоположность любой другой мышце нечувствительна к инсулину, и количество гликогена в сердце может меняться совсем не так, как во всех других мышцах.

15.5.4. Наследственные расстройства и метаболизм гликогена

Мутации, которые приводят к ослаблению каталитической активности ферментов, функционирующих в жизненноважных метаболических путях (гликолиз, цикл лимонной кислоты, синтез белка и т. п.), необязательно являются летальными. Мутации могут обнаруживаться на путях, которые полезны, но не абсолютно жизненно необходимы; такие мутации могут вызвать заболевания, они не обязательно несовместимы с продолжением жизни. Метаболизм гликогена великолепно иллюстрирует эту концепцию; в настоящее время известны наследственные расстройства, связанные с отсутствием какого-либо одного из ферментов метаболизма гликогена (табл. 15.3). Все эти расстройства, за исключением связанного с отсутствием гликоген-синтазы, характеризуются накоплением гликогена в тканях. Отсутствие печеночной глюкозо-6-фосфатазы не дает возможности отвечать на сигнал о дополнительном введении глюкозы в кровь. Отсутствие ферментов, расщепляющих связи в местах ветвления, или гликоген-ветвящих ферментов, приводит к накоплению гликогенов с аномальной дли-

Таблица 15.3
Наследственные расстройства метаболизма гликогена

Тип расстройства	Дефектный фермент	Структура гликогена	Орган	Общепринятое название	Предлагаемое клиническое название
I	Глюкозо-6-фосфатаза	Нормальная	Печень, почки, кишечник (?)	Болезнь фон Гирке	Дефектный по глюкозо-6-фосфатазе гепаторенальный гликогеноз
II	α -1,4-глюкозидаза	»	Повсеместно	Болезнь Помпе	Дефектный по α -1,4-глюкозидазе общий гликогеноз
III	Амило-1,6-глюкозидаза	Аномальная; наружные цепи отсутствуют или сильно укорочены	Печень, сердце, мышцы, лейкоциты	Болезнь Кори	Дефектный по ферменту, расщепляющему связи в местах ветвления, остаточный декстриноз
IV	Амило-(1,4 $\rightarrow$ 1,6)-трансгликозилаза	Аномальная; очень длинные внутренние цепи наружные неразветвленные	Печень, возможно и другие органы	Болезнь Андерсена	Дефектный по гликогенветвящему ферменту амилопектиноз
V	Мышечная гликогенфосфорилаза	Нормальная	Скелетная мышца	Болезнь Мак-Ардла — Шмида — Пирсона	Дефектный по миофосфорилазе гликогеноз
VI	Печеночная гликогенфосфорилаза	»	Печень, лейкоциты	Болезнь Герса	Дефектный по гепатофосфорилазе гликогеноз
VII	Мышечная фосфофруктокиназа	»	Мышца		Дефект мышечной фосфофруктокиназы
VIII	Киназа фосфорилазы печени	»	Печень		Дефект печеночной киназы фосфорилазы
IX	Печеночная гликогенсинтаза	Ограничена в количестве	»	»	Дефектный по синтезу печеночный гликогеноз

ной ветвей. Тот факт, что не наблюдается корреляции между неспособностью к образованию печеночной и мышечной фосфорилаз свидетельствует о том, что эти ферменты различны и каждый находится под независимым генетическим контролем.

Каждое из гликогеновых расстройств серьезно влияет на продолжительность жизни человека (сокращая ее). Тип II обычно летален в раннем детстве. Каждое из обсуждаемых здесь заболеваний влечет за собой потребность в частом кормлении. У детей, лишенных печеночной гликоген-синтазы, наблюдается склонность к гипогликемическим судорогам, потому что скорость глюконеогенеза недостаточна для поддержания уровня глюкозы в крови и в период между кормлениями. В раннем детстве эту трудность можно преодолеть, однако увеличение физической нагрузки при таком, а также при других расстройствах гликогенового метаболизма может способствовать очень быстрому снижению уровня глюкозы в крови. Когда затронут метаболизм мышечного гликогена, наступают серьезная мышечная слабость и неспособность к осуществлению мышечной работы. В целом эти расстройства свидетельствуют о решающей роли гликогена печени в поддержании уровня глюкозы в крови и мышце как источника энергии для интенсивной мышечной работы.

15.6. Глюкоза крови и регуляция метаболизма гликогена

Постоянное использование глюкозы требует подачи ее ко всем тканям через кровь. Нормальная концентрация глюкозы в крови человека спустя 8—12 ч после еды составляет 70—90 мг/мл. Несколько более высокие значения наблюдаются немедленно после приема пищи; продолжительное голодание сопровождается лишь незначительным снижением или вообще не сказывается на уровне глюкозы в крови в течение нескольких суток.

Зависимость различных тканей от количества глюкозы, находящейся в кровяном русле, сильно варьирует. Эта зависимость, пожалуй, наиболее резко выражена для центральной нервной системы, поскольку глюкоза — главный источник энергии, проникающий сквозь гемато-энцефалический барьер (гл. 37) со скоростью, достаточной для поддержания нормальной функции. Если концентрация глюкозы в крови резко падает, то самые первые наблюдаемые в результате этого симптомы относятся к центральной нервной системе. Многие ткани, такие, как мышца, могут получать значительную долю необходимой химической энергии от других питательных веществ, таких, как ацетоацетат (разд. 17.10.3), и поэтому не зависят столь решающим образом от поддержания концентрации глюкозы в крови. Сердечная мышца эффективно

извлекает жирные кислоты и лактат из крови и использует их в качестве источника энергии. Эта способность сердечной мышцы делает ее относительно нечувствительной к колебаниям уровня глюкозы в крови и придает сердцу большую степень приспособляемости к вариациям в составе питательной среды.

Сохранение относительно устойчивой нормальной концентрации глюкозы в крови, несмотря на различные мешающие факторы, может служить примером *гомеостатической регуляции*. Термин *гомеостаз* предложен Кенноном для обозначения ответа организма на воздействия, которые путем изменения концентрации какого-либо компонента инициируют серию событий, направленных на восстановление его нормальной концентрации. Все гомеостатические механизмы могут рассматриваться как физиологические аналоги механизмов обратной связи в технике.

15.6.1. Источники и превращения глюкозы крови

В результате всасывания продуктов переваривания углеводов в кровь поступает большое, хотя и подверженное колебаниям, количество глюкозы. Это не непрерывный процесс, поскольку большая часть перевариваемых углеводов всасывается в пределах нескольких часов после приема богатой углеводами пищи. Постоянным источником глюкозы в крови служит идущий в печени, почках и кишечнике гидролиз глюкозо-6-фосфата, который образуется либо при гликогенолизе, либо из других возможных предшест-

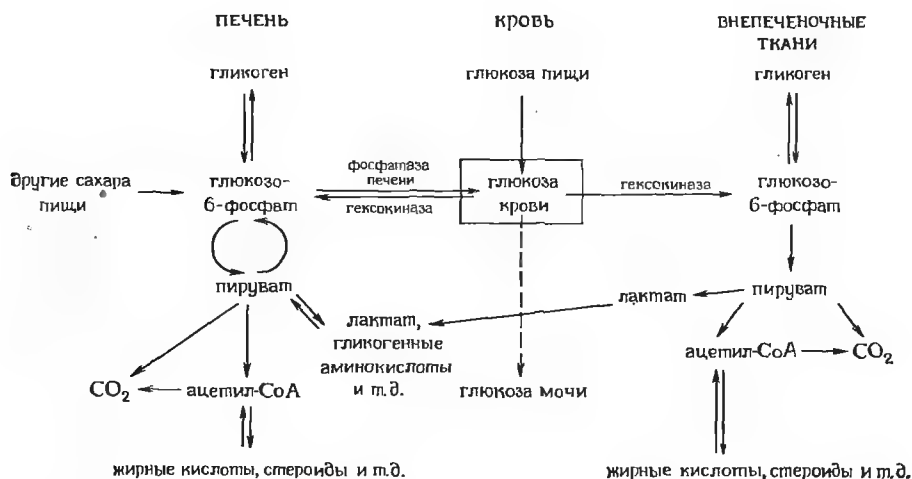


Рис. 15.10. Источники и пути превращения глюкозы в крови.

венников. Разнообразные пути использования глюкозы крови показаны на рис. 15.10. В норме не более чем следы глюкозы выделяются с мочой независимо от диеты. При различных аномальных условиях, однако, потеря глюкозы с мочой может быть настолько существенной, что приближается к суммарному количеству принятой с пищей глюкозы и дополнительной глюкозы, которая образовалась из глюкогенных компонентов пищи. Механизмы, обуславливающие *глюкозурию*, обсуждаются в гл. 35.

15.6.2. Факторы, влияющие на концентрацию глюкозы в крови

Концентрация глюкозы в крови определяется относительными скоростями образования глюкозы из гликогена, аминокислот и других источников, всасывания глюкозы из кишечного тракта, утилизации глюкозы и потери глюкозы с мочой. Скорость удаления глюкозы из крови в известной степени зависит от содержания глюкозы во внеклеточных компартментах; чем выше концентрация глюкозы, тем быстрее совершается ее ассимиляция такими тканями, как печень и мышца. Сокращение мышцы сопровождается усиленным передвижением глюкозы в мышечные клетки даже при постоянстве внеклеточной концентрации глюкозы. Вероятно, это объясняется активизацией механизма, который ответственен в норме за облегченный транспорт глюкозы (разд. 11.3.2). При гипергликемии стимулируется образование продуктов превращения глюкозы, особенно гликогена и жирных кислот в печени и жировой ткани.

Введение инсулина сопровождается быстрым снижением концентрации глюкозы в крови и усилением образования продуктов превращения глюкозы. Инсулин увеличивает скорость переноса глюкозы из внеклеточного компартмента во внутриклеточный (гл. 46). В результате снижается K_m для транспорта глюкозы и одновременно возрастает V_{max} . Синтез гликогена в мышцах и жирных кислот в печени и жировой ткани усиливается; приближение значения дыхательного коэффициента при голодании (разд. 11.1.3) к единице показывает, что более значительная часть выдыхаемой CO_2 происходит из глюкозы. Напротив, при сахарном диабете у животного, подвергнутого панкреатэктомии, или у животного, отравленного аллоксаном (разд. 7.1.1), который преимущественно повреждает В-клетки поджелудочной железы, отчетливо выражена пониженная утилизация глюкозы. Концентрация глюкозы в крови имеет тенденцию к повышению до уровней, характерных для глюкозурии, и продукция гликогена снижается. Жирные кислоты синтезируются в печени и жировой ткани с субнормальными скоростями. Введением глюкозы не удастся вызвать ни увеличения концентрации лактата в крови, ни приближения

к значению, свойственному не страдающему диабетом животному. Однако даже у животного с выраженным диабетом все же продолжается утилизация глюкозы, особенно в тканях мозга и миокарда, и, более того, скорость ее утилизации зависит от содержания глюкозы в крови. В этом смысле гипергликемию при диабете следует рассматривать как полезное приспособление, благоприятствующее ассимиляции глюкозы в организме, в котором из-за отсутствия инсулина в противном случае был бы чрезвычайно ограничен вход глюкозы в клетки. Тем не менее мышцы и печень диабетиков неспособны получать нормальное питание от их гипергликемической среды; эта ситуация получила меткое название «гибель среди изобилия».

Многие последствия диабета напоминают эффект голодания, или более точно, лишения углеводов. Наиболее разительное отличие состоит в том, что страдающему диабетом субъекту свойственна гипергликемия, в то время как у голодающего концентрация глюкозы в крови может быть слегка ниже нормы.

Гиперинсулинизм может возникать в связи с гиперплазией или неоплазией В-клеток островков Лангерганса. Ответ различных органов на инсулин чрезвычайно неодинаков. В то время как ассимиляция глюкозы крови мышечными клетками стимулируется при гиперинсулинизме, ничего подобного не происходит в мозге. Центральная нервная система, таким образом, оказывается в неблагоприятном положении в ее конкуренции с другими тканями за доступную глюкозу, и, когда содержание глюкозы в крови уменьшается, могут наступить нарушения деятельности центральной нервной системы и судороги.

В то время как инсулин понижает концентрацию глюкозы в крови, действие по меньшей мере четырех групп гормонов направлено на повышение содержания глюкозы в крови. Аденогипофиз секретирует вещества, которые, хотя бы внешне, ведут себя как антагонисты действия инсулина. Удаление гипофиза у животного, подвергнутого панкреатэктомии, в значительной степени исправляет его нарушенный метаболизм (гл. 48). Животное, у которого был удален гипофиз, исключительно чувствительно к введенному инсулину, и эта чувствительность может быть изменена повторной инъекцией некоторых аденогипофизарных гормонов. Продолжительное введение этих гормонов, особенно соматотропина (гормон роста) и адренокортикотропина (гл. 49), вызывает устойчивую гипергликемию и в конце концов приводит к повреждению панкреатических В-клеток. Повреждение, которое может привести к хроническому диабету, связано, очевидно, с гипергликемией как таковой, поскольку подобное нарушение может быть обусловлено длительным и избыточным введением глюкозы.

Глюкагон из поджелудочной железы и адреналин из мозгового слоя надпочечников способствуют увеличению уровня сахара в

крови путем освобождения глюкозы из печени. Адреналин быстро вызывает гипергликемию, иногда достаточную для превышения почечного порога, при котором сахар начинает выделяться с мочой. Некоторые адренокортикоидные стероиды (гл. 45) могут также вызывать гипергликемию, но их эффекты замедлены и не столь сильно выражены. Напротив, гипогликемия наблюдается у животных, подвергнутых удалению надпочечников, или у людей, страдающих болезнью Аддисона (гл. 45), если они вовремя не получают пищу. У гипертиреозных животных проявляется слабый диабет при почти полном отсутствии гликогена в печени.

Подъем концентрации глюкозы в крови может вызываться либо ее чрезмерной продукцией, либо пониженной утилизацией. Недостаточное использование глюкозы характерно для животного, либо испытывающего дефицит инсулина, либо в избытке выделяющего гипоталамические гормоны. Основной дефект заключается в неспособности глюкозы проходить через барьер мышечной и других клеточных мембран. Такая ситуация вызывает ряд вторичных явлений, которые приводят к усилению глюконеогенеза; это становится возможным благодаря увеличению активности пируваткарбоксилазы, фосфоенолпируваткарбоксикиназы и фруктозодифосфатазы — специальной группы ферментов, необходимых для синтеза глюкозы из пирувата (разд. 14.4). Причина возрастания активности — абсолютное увеличение количеств этих ферментов, синтез которых нуждается в присутствии адренокортикоидных гормонов и не происходит у животных с удаленными надпочечниками. Действительно, стероиды коры надпочечников, введенные здоровым животным, вызывают подобный синтез этих ферментов. В то же время адренокортикоидные гормоны вызывают изменения в микросомах печени, сопровождающиеся увеличением активности их глюкозо-6-фосфатазы, в результате чего образующийся из пирувата глюкозо-6-фосфат быстро гидролизует до глюкозы. Более того, путем ингибирования синтеза белка и усиления активности аминотрансфераз в печени гормоны надпочечников способствуют усилению притока аминокислот, попадающих в русло метаболизма через те пути, которые приводят к образованию пирувата; таким образом обеспечивается исходный материал для глюконеогенеза. Наконец, в печени, которая обычно подает глюкозу в кровяное русло, прекращается синтез жирных кислот из ацетил-СоА (разд. 17.6) частично из-за того, что пониженная концентрация фруктозодифосфата больше не стимулирует синтез малонил-СоА (разд. 17.6) и вместо этого жирные кислоты утилизируются в качестве главных субстратов окисления. Эти жирные кислоты происходят как из липидов печени, так и из липидов жировой ткани, в которой липолиз усиливается в отсутствие инсулина и при наличии как стероидов коры надпочечников, так и адренокор-

тикотропного гормона (гл. 48). В свою очередь это служит причиной увеличения продукции ацетил-СоА, необходимого для действия пируваткарбоксилазы, в результате которого обеспечивается генерация NADH и ATP; NADH требуется для восстановления 1,3-дифосфоглицерата в глицеральдегид-3-фосфат, а ATP расходуется на различных стадиях глюконеогенеза из пирувата (разд 14.4). Заметим, что какой-либо источник NADH необходим, поскольку исходным материалом глюконеогенеза является пируват, а не лактат.

Инсулин не только облегчает проникновение глюкозы в клетки, но также определенным образом оказывает подавляющее воздействие на синтез пируваткарбоксилазы, фосфоенолпируваткарбоксикиназы и фруктозодифосфатазы (см. выше). В печени и жировой ткани, подвергнутых воздействию инсулина, обнаруживаются также повышенные количества глюкокиназы, отмечается увеличенная активность гликоген-синтазы, более интенсивное функционирование фосфоглюконатного пути, предлагающего NADPH для синтеза жирных кислот (разд. 14.8), и возросший синтез жирных кислот из глюкозы либо из пирувата. Инсулин также способствует синтезу белков из аминокислот (гл. 46), снижая таким образом приток глюконеогенных предшественников.

Адреналин и глюкагон влияют на содержание глюкозы в крови, что в основном связано с их гликогенолитическим действием (см. выше). Способ действия тиреоидных гормонов при увеличении концентрации глюкозы в крови неизвестен.

15.6.3. Толерантность к глюкозе

Способность животного использовать вводимую глюкозу обозначают как толерантность к глюкозе. Когда глюкоза вводится (либо через рот, либо в вену), ее концентрация в крови быстро возрастает. В оральном тесте на толерантность к глюкозе при обычной дозе 1 г глюкозы на килограмм массы тела концентрация глюкозы в крови в течение ~ 1 ч может возрасти от ~ 90 мг на 100 мл при голодании до максимального уровня, достигающего величины 140 мг на 100 мл. К этому времени скорость поступления глюкозы в кровь начинает снижаться, в то время как скорость ее потребления тканями возрастает, так что наступает снижение концентрации в крови. При этих условиях возросшая скорость удаления глюкозы из крови определяется следующими причинами: во-первых, скорость поступления глюкозы в клетки прямо пропорциональна концентрации глюкозы во внеклеточной жидкости и, во-вторых, повышение уровня глюкозы в крови стимулирует нормальную поджелудочную железу к выделению инсулина в кровь с повышенной скоростью (гл. 46). В связи с увеличением притока

глюкозы в клетки наблюдается ускорение гликогенеза, особенно в мышце, а также усиление гликолиза, как об этом свидетельствует увеличение содержания лактата в крови; дыхательный коэффициент растет, увеличиваясь в сторону единицы, что указывает на большую интенсивность окисления углеводов, и содержание глюкозы в крови быстро падает. Обычно в конце второго часа концентрация глюкозы в крови становится приблизительно нормальной и часто продолжает уменьшаться, опускаясь ниже исходного уровня, вероятно, в результате продолжающегося влияния секреции инсулина (рис. 15.11). По мере исчезновения гипергликемии, стимулирующей островки Лангерганса, секреция инсулина возвращается к более низкому уровню.

В ходе орального теста на толерантность к глюкозе в норме у человека концентрация глюкозы в крови никогда не превышает значения, при котором сахар начинает выводиться с мочой и не возникает глюкозурии. У людей, страдающих диабетом, испытывающих недостаточность инсулина, содержание глюкозы в крови в периоды голодания повышено. После орального введения глюкозы уровень сахара в крови становится даже более высоким, зачастую превышая почечный порог и вызывая глюкозурию. Инсулиновый ответ в этом случае будет недостаточным или совсем не проявится, и в результате падение концентрации глюкозы в крови будет происходить медленно. Человеку с таким типом ответа, как принято говорить, свойственна пониженная толерантность к глюкозе или повышенная кривая глюкозной толерантности (рис. 15.11).

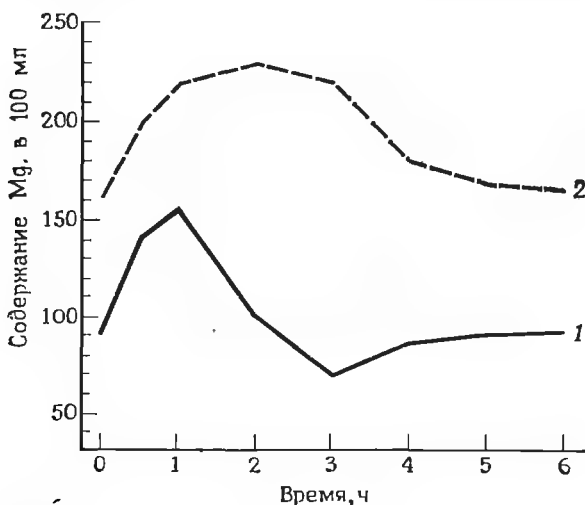


Рис. 15.11. Типичные кривые глюкозной толерантности. 1 — для нормального человека; 2 — для человека, страдающего диабетом.

У людей, страдающих *гиперинсулинизмом*, исходная концентрация глюкозы в крови часто более низка, чем в норме. Вскоре после того, как вслед за приемом глюкозы ее содержание в крови начинает подниматься, происходит секреция инсулина. Благодаря этому содержание глюкозы в крови начинает снижаться и в связи с избыточным инсулиновым ответом часто продолжает падать до таких низких уровней, как 40 мг/100 мл, что вызывает появление симптомов расстройства центральной нервной системы (гипогликемических судорог). Таким образом, эти люди проявляют аномально высокую толерантность к глюкозе. Отмечены разнообразные другие отклонения от нормальной картины глюкозной толерантности. При спру в результате нарушения всасывания глюкозы из просвета кишечника уплощенная кривая глюкозной толерантности может быть получена после оральной дачи глюкозы, хотя нормальная картина наблюдается после парентерального введения глюкозы.

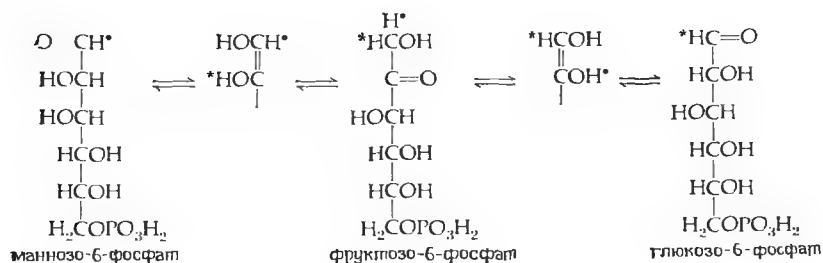
15.7. Взаимопревращение гексоз

Все моносахариды, найденные в весьма разнообразных биологических олиго- и полисахаридах, вырабатываются из глюкозы теми же самыми клетками, которые образуют полисахариды. Для синтеза гликозидной связи каждый из моносахаридов должен присутствовать в форме нуклеозиддифосфата сахара аналогично UDPглюкозе, используемой для образования гликогена. На рис. 15.12 показаны пути, ведущие от глюкозо-6-фосфата к каждому из нуклеозиддифосфатов сахаров, утилизируемых для такого рода синтезов в клетках животных. Отметим, что из этого общего правила существует одно исключение: N-ацетилнейраминовая кислота используется в форме производного цитидинмонофосфата. Отметим также, что на этой схеме находят свое место все главные пуриновые и пиримидиновые основания ДНК и РНК, включая аденин. У растений и бактерий, однако, многие синтетазы полисахаридов утилизируют ADРсахара, например при синтезе крахмала.

15.7.1. Альдозо-кетозные превращения; изомеразы

Взаимопревращения глюкозо-6- и фруктозо-6-фосфатов при участии *фосфоглюкозоизомеразы* были описаны в разд. 14.4.1. *Фосфоманнозоизомераза* катализирует аналогичную реакцию. Действие обоих ферментов происходит с образованием промежуточного эндиола. В этой реакции один из двух атомов водорода при С-1 кетозы обменивается с протонами воды. Обе изомеразы стереоспецифичны, но только для двух различных атомов водоро-

да, обозначенных соответственно Н· и Н*, в следующих структурах:

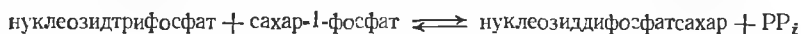


15.7.2. Мутазы

Небольшая группа ферментов катализирует имеющую значение для ряда процессов реакцию, которая, по существу, представляет собой внутренний перенос фосфата от одной гидроксидной группы к другой в пределах той же молекулы по типу фосfogлюкомутазной (разд. 15.3.3) и фосfogлицеромутазной (разд. 14.4.2) реакций, которые были описаны ранее. Фосfogлюкомутаза может также функционировать по этому типу с маннозофосфатом и N-ацетилглюкозаминфосфатом, но имеются также и специфические мутазы для обоих этих субстратов в печени и других тканях.

15.7.3. Пирофосфорилазы

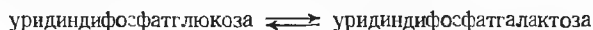
Главная пирофосфорилаза животных тканей, а именно та, которая участвует в синтезе уридиндифосфатглюкозы, уже рассматривалась (разд. 15.3.8). Реакция описывается уравнением



Все известные в настоящее время сахарные компоненты нуклеозиддифосфатсахаров перечислены в табл. 15.4. Пирофосфорилазная реакция не ограничена только образованием сахарофосфатов. CDPглицерин и CDPрибит образуются подобным образом из глицерол- и рибитолфосфатов у тех бактерий, у которых тейхоевая кислота входит в состав клеточной стенки (разд. 15.10.2). Многие нуклеозиддифосфатсахара не образуются непосредственно из сахара или сахарофосфата, а возникают в ходе метаболизма только благодаря превращениям существующего нуклеозиддифосфатсахара. Некоторые примеры были приведены на рис. 15.12.

15.7.4. Эпимеразы

Эпимеризация — это относительно общая реакция в метаболизме углеводов. Наиболее известным примером является эпимеризация у C-4 UDPглюкозы, дающая UDPгалактозу; эта реакция катализируется в печени *уридиндифосфатглюкозоэпимеразой*, представляющей собой тетрамер (мол. масса ~250 000), и в общем виде может быть записана следующим образом:



Этот фермент, как и все другие эпимеразы такого рода, проявляет абсолютную потребность в NAD^+ , который прочно связан с ферментом.

Специальный случай эпимеризации представляет собой мутаротация глюкозы, катализируемая *мутаротазой*, которая очень широко распространена в тканях животных. Эпимераза, имеющаяся в растениях, катализирует образование UDPарабинозы из UDPксилозы. Особенно интересна эпимераза животных тканей, катализирующая суммарную реакцию



Таблица 15.4

Некоторые сахарные компоненты нуклеозиддифосфатсахаров^а

Нуклеозиддифосфат	Сахар
Уридиндифосфатные эфиры (UDP-X ⁺)	Глюкоза, галактоза ^б , глюкозамин ^б , маннозамин ^б , N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин ^б , муравовая кислота ^б , глюкуроновая кислота, галактуроновая кислота, ксилоза, арабиноза ^б , рамноза
Аденозиндифосфатные эфиры (ADP-X)	Глюкоза
Гуанозиндифосфатные эфиры (GDP-X)	Глюкоза, галактоза ^б , манноза ^б , фруктоза ^б , рамноза ^б , колитоza
Цитидиндифосфатные эфиры (CDP-X)	Глюкоза, тивелоза, аскарилоза, паратоза, абеквоза
Цитидинмонофосфатные эфиры (CMP-X) ^в	N-ацетилнейраминовая кислота ^б
Тимидиндифосфатные эфиры (dTDP-X)	Глюкоза, галактоза, манноза, глюкозамин, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, рамноза

^а X — один из сахаров, перечисленных в следующей колонке таблицы.

^б Обнаружен только в тканях животных.

^в Нуклеозидмонофосфатсахар.

Эта реакция осуществляется на пути, ведущем к СМР-N-ацетилнейраминовой кислоте, и служит пусковой стадией процесса. Поэтому заслуживает внимания то обстоятельство, что СМР-N-ацетилнейраминовая кислота — аллостерический ингибитор этой реакции. Этот же фермент может катализировать эпимеризацию самого N-ацетилглюкозамина непосредственно в N-ацетилманнозамин, но эта реакция, по-видимому, имеет лишь небольшое физиологическое значение. АТФ играет роль аллостерического положительного эффектора, который снижает K_m субстрата. L-Идуруновая кислота, эпимер D-глюкуроновой кислоты — важный компонент дерматансульфатов, гепарина и гепарансульфата (гл. 38). Однако идуроновая кислота не встраивается в эти гликозамингликаны из UDP-идуруновой кислоты, как это предполагали раньше, а образуется при участии эпимеразы, которая действует на D-глюкуроновую кислоту, **находящуюся в составе полимерного предшественника гетероолигосахарида** (разд. 15.8.3).

15.7.5. Аспекты метаболизма галактозы

Как отмечено выше, главный путь, ведущий к галактозе, необходимой для синтеза полисахаридов, проходит через обратимую эпимеризацию UDPглюкозы. Метаболизм принимаемой с пищей галактозы начинается с фосфорилирования в положении С-1 при помощи АТФ, которое катализируется *галактокиназой*. Галактокиназа печени плода и ребенка характеризуется K_m и V_{max} , примерно в 5 раз превосходящими таковые у ферментов взрослого организма. Главная участь галактозо-1-фосфата в печени — это превращение в ходе реакции, катализируемой *галактозо-1-фосфат — уридилтрансферазой*:



Эта уникальная трансферазная реакция приводит к возвращению галактозы в основное русло углеводного метаболизма, поскольку UDPгалактоза может тогда подвергнуться эпимеризации в UDPглюкозу. Наследственная утрата фосфогалактозоуридилтрансферазной активности является основной причиной галактоземии — детского заболевания, которое заключается в неспособности усваивать галактозу из лактозы молока, в результате чего отсутствует рост и образуются катаракты. В эритроцитах больных галактоземией содержится белок, иммунологически тождественный нормальной трансферазе, но лишенный каталитической активности; поэтому можно полагать, что он отличается только замещением одного или нескольких аминокислотных остатков в активном центре.

15.7.6. Метаболизм фруктозы

Несмотря на то что фруктоза может медленно фосфорилироваться в положении 6 при действии неспецифических киназ, большая часть принятой с пищей фруктозы подвергается фосфорилированию в печени при участии особой *фруктокиназы*, специфически направляющей фосфорилирование в положение С-1 этой кетозы. Неизвестна мутаза, которая могла бы катализировать превращение фруктозо-1-фосфата в фруктозо-6-фосфат, но неспособна катализировать синтез фруктозодифосфата из фруктозо-1-фосфата и фосфотруктокиназы (разд. 14.4.2). Единственный доступный для превращения фруктозо-1-фосфата путь становится возможным благодаря участию специфической альдолазы, которая катализировать реакцию

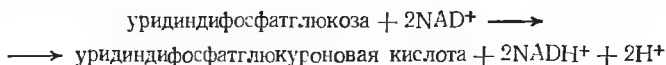


Дальнейший метаболизм глицеральдегида заключается в восстановлении за счет NADH до глицерина, который затем фосфорилируется глицеролкиназой, использующей АТР; глицерол-3-фосфат окисляется при участии NAD до диоксиацетонфосфата. Последний затем включается в обычную гликолитическую последовательность.

У людей, которые лишены фруктокиназы, основная масса принимаемой с пищей фруктозы просто выводится с мочой. *Непереносимость фруктозы* относится к числу наиболее серьезных заболеваний; оно характеризуется генетическим дефектом альдолазы, специфичной к фруктозо-1-фосфату, который накапливается после приема фруктозы и ингибирует различные ферментные системы. Даже здоровые люди могут испытывать трудности при потреблении больших количеств фруктозы. Несмотря на присутствие киназы и специальной альдолазы с высокими и адекватными активностями, фруктозо-1-фосфат может накапливаться в печени в течение некоторого времени после большого притока фруктозы, например в случае потребления большого количества сахарозы. Предложено следующее объяснение этого явления. В связи с действием киназы [АТР], и, следовательно, [Р_i], в клетках печени убывают. Ингибирование дезаминазы адениловой кислоты Р_i (гл. 36) таким образом снимается, и накапливается инозиновая кислота (IMP); при таких условиях в интактной, перфузируемой печени за 10 мин [IMP] возрастает в семь раз. Однако IMP — мощный ингибитор фруктозо-1-фосфат-альдолазы ($K_i = 0,1$ ммоль/л и $K_m^{F-1-P} = 0,18$ ммоль/л), и в результате дальнейший метаболизм фруктозо-1-фосфата задерживается.

15.7.7. Окисление; образование уроновых кислот

Глюкуроновая кислота образуется путем окисления уридиндифосфатглюкозы:

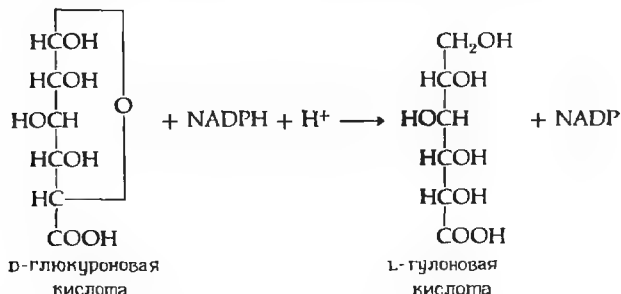


Один фермент катализирует обе последовательные стадии окисления, необходимые для образования карбоксильной группы из первичной спиртовой; предполагаемый интермедиат, в котором С-6 находился бы на альдегидном уровне окисления, не обнаружен. Однако синтетическая UDPдиглюкоальдоза, предполагаемый промежуточный продукт реакции, исключительно прочно связывается с ферментом. Добавление NADH восстанавливает ее вновь до UDPглюкозы, а NAD⁺ приводит к очень быстрому окислению до UDPглюкуроновой кислоты. Очевидно, роль этого вещества как связанного с ферментом промежуточного продукта можно считать доказанной.

Неизвестно, каким способом свободная глюкуроновая кислота образуется в клетках животных, если только бактериальный путь

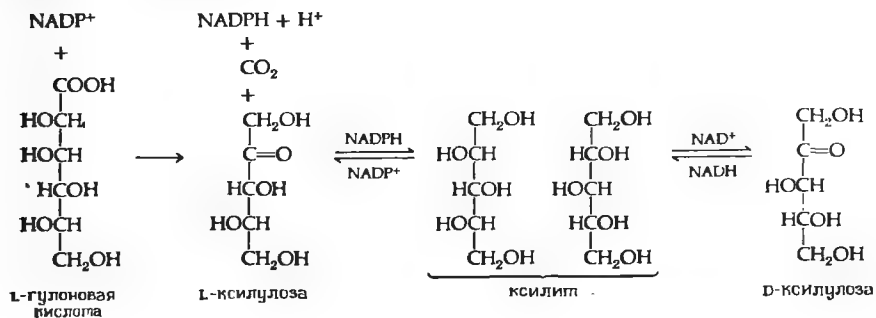


не действует также и у животных. Каково бы ни было ее происхождение, глюкуроновая кислота может быть восстановлена в L-гулоновую кислоту. У растений и животных, кроме приматов и морских свинок, образованная таким образом L-гулоновая кислота участвует в синтезе аскорбиновой кислоты (гл. 50).



У всех млекопитающих гулоновая кислота может окисляться до L-ксилулозы. Однако в реакциях фосфоглюконатного окислительного пути, описанного ранее (гл. 14), участвует именно D-ксилулозо-5-фосфат. Как показано ниже, -ксилулоза может превра-

щаться в D-ксилулозу путем восстановления до ксилита и последующего окисления:



Предполагается, что D-ксилулоза может фосфорилироваться за счет АТФ при участии соответствующей киназы до D-ксилулозо-5-фосфата и затем вступать в реакции фосfogлюконатного окислительного пути. В конечном итоге такой процесс представляет собой еще один обходный путь окисления глюкозы, минуящий реакции анаэробного гликолиза и цикла лимонной кислоты. Масштаб этих реакций еще не подвергался количественной оценке. Возникающий в этом процессе CO_2 происходит из C-6 глюкозы в противоположность фосfogлюконатному окислительному пути, где CO_2 происходит из C-1 атома глюкозы.

Аномалия, известная под названием *идиопатической пентозурии*, вероятно, связана с наследственным отсутствием фермента, который восстанавливает L-ксилулозу. В результате этого большие количества L-ксилулозы появляются в моче. У таких людей прием с пищей D-глюкуроновой кислоты сопровождается мощным выделением L-ксилулозы.

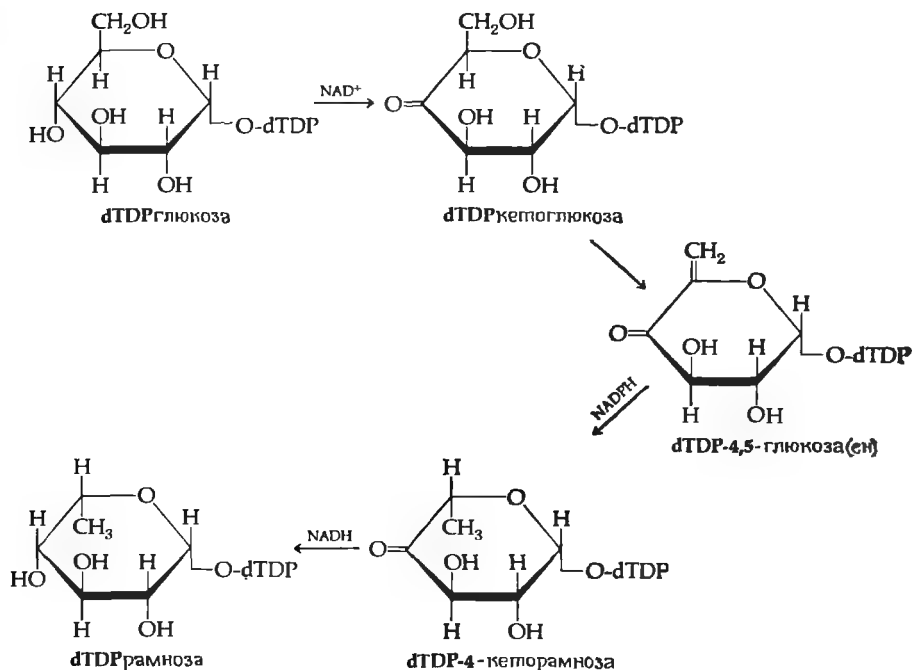
15.7.8. Многоатомные спирты

Хотя многие полиолы подвергаются превращениям у бактерий, роль этих соединений в метаболизме млекопитающих ограничена. В семенных пузырьках восстановление глюкозы за счет NADPH в сорбит с последующим его окислением приводит к образованию фруктозы, которая в больших количествах содержится в семенной жидкости (гл. 44). Восстановление других сахаров происходит подобным образом, хотя и в ограниченной мере, во многих тканях. Так, дульцит, продукт восстановления галактозы, накапливается в хрусталике крыс, получавших галактозу, и оказывается существенным фактором в формировании катаракты при галактоземии (гл. 40).

Циклический инозит (разд. 3.3.2.4) в изобилии встречается в растениях в виде гексафосфатного эфира, и присутствие фосфатидилинозита в мозге (гл. 37) служит указанием на важную роль инозита у млекопитающих. За исключением продемонстрированной возможности образования инозита из глюкозы у безмикробных животных, известно очень мало о происхождении этого вещества. У дрожжей синтез инозита начинается с глюкозо-6-фосфата и требует участия NAD^+ . Распад инозита, по-видимому, начинается с его окисления до глюкоурановой кислоты, которое катализируется *инозитолоксигеназой*.

15.7.9. Оксидоредуктазы; образование дезоксигексоз

Дезоксигексозы и дидезоксигексозы встречаются в полисахаридах как животного, так и растительного происхождения.



Синтез этих восстановленных сахаров начинается от нуклеозиддифосфатсахаров путем двух общих окислительно-восстановительных реакций, которые катализируются *оксидоредуктазами*. До сего времени указанные ферменты выделены только из бактерий, но

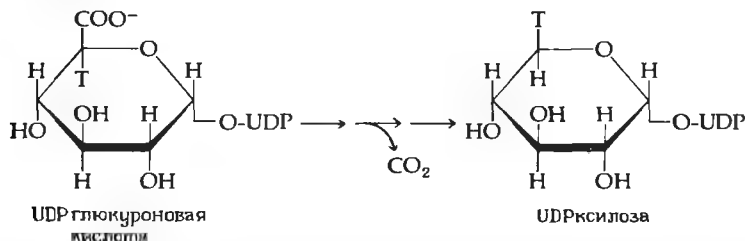
вероятно, что подобные ферменты используются и в клетках млекопитающих. В каждом случае один фермент, который содержит один прочносвязанный NAD^+ на молекулу, нуждается в экзогенном NADPH в качестве восстановителя. Путь образования dTDP рамнозы приведен в качестве примера. Предположение о существовании связанных с ферментом промежуточных продуктов, хотя и подкрепляется рядом убедительных данных, все еще не может считаться окончательно доказанным.

Аналогичные промежуточные продукты обнаружены в процессе образования GDPфукозы из GDPманнозы у бактерий и, согласно предположениям, должны участвовать в образовании таких дидезоксисахаров, как GDP-3,6-дидезокси- L -галактоза (колитоза), CDP-3,6-дидезокси- D -манноза (тивелоза), CDP-3,6-дидезокси- L -манноза (аскарилоза) и CDP-3,6-дидезокси- D -глюкоза (паратоза).

4-Аминодидезоксигексозы образуются при участии специфических аминотрансфераз, которые переносят эквивалент NH_3 в положение 4, например, у 4-кеторамнозы или 4-кетофруктозы. Специфичность этих ферментов определяет последующую конфигурацию у C-4; так, dTDP-4-кеторамноза может дать начало или dTDP-4-аминодидезоксиглюкозе, или dTDP-4-аминодидезоксигалактозе.

15.7.10. Декарбоксилирование

Единственный известный случай декарбоксилирования нуклеозиддифосфатсахаров — превращение UDPглюкуроновой кислоты в UDPксилозу, которая утилизируется для образования ксилозидов путем связывания с гидроксидными группами серина при синтезе протеогликана (гл. 38). Соответствующий фермент нуждается в NAD^+ , вероятно, потому, что реакция включает также инверсию у положения 5, обнаруживаемую лишь тогда, когда в этом положении находится меченый водород, например тритий (см. ниже). Возможно, что какое-то 4-кето-производное опять-таки является промежуточным продуктом.



UDPксилоза, конечный продукт этих реакций (см. рис. 15.12), представляет собой аллостерический регулятор окисления UDPглюкозы в UDPглюкуроновую кислоту. В строении рогамицы,

центре активного синтеза протеогликана, фермент, ведущий реакцию декарбоксилирования, в стационарном состоянии ингибирован на $\sim 90\%$; в носовом хряще он подавлен на $\sim 50\%$, но в коже новорожденного — лишь на $\sim 20\%$. Эти данные согласуются с относительными концентрациями UDPксилозы и UDPглюкуроновой кислоты в каждой из этих тканей; [UDPксилоза] составляет 72,7 и 10 мкмоль/л, в то время как [UDPглюкуронат] — 364, 70 и 210 мкмоль/л соответственно для стромы роговицы, носового хряща и кожи новорожденного.

15.7.11. Образование аминсахаров

Начальный этап в образовании аминсахаров состоит в переносе амидной группы глутамина на фруктозо-6-фосфат с образованием глюкозамин-6-фосфата:



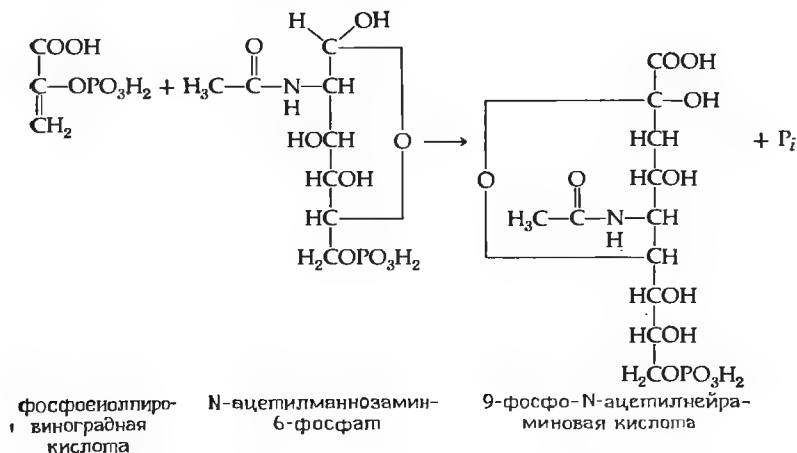
Фермент из печени (мол. масса $\sim 380\,000$), имеющий $K_m^{\text{F-6-P}} = 0,1$ ммоль/л и $K_m^{\text{глутамин}} = 0,7$ ммоль/л, неактивен с NH_3 . Регуляция активности по типу обратной связи осуществляется в довольно сложной форме отрицательным эффектором UDP-N-ацетилглюкозамином (как это следует из дальнейшего). Глюкозо-6-фосфат сам по себе не оказывает влияния на фермент, но снижает K_i для ингибитора. АМР — ингибитор, но только в том случае, когда первичный ингибитор уже связан с ферментом, УТР не влияет на фермент, но может препятствовать связыванию ингибитора. Кинетические измерения показывают, что ни один из этих эффектов не может быть отнесен к числу аллостерических. Значения K_m и K_i позволяют полагать, что фермент печени функционирует со скоростью, составляющей $\sim 50\%$ V_{max} , и, вероятно, на долю катализируемой им реакции приходится $\sim 0,5\%$ всей глюкозы, протекающей через печень. Регуляция, вероятно, имеет большее значение в таких тканях, как кожная, где этот путь охватывает от 10 до 20% протекающей глюкозы.

Различные артроподы, включая пассивных, используют UDP-N-ацетилглюкозамин для образования хитина — компонента из наружных скелетных структур. У этих видов, как и у бактерий, для синтеза глюкозамин-6-фосфата используется NH_3 вместо глутамина, и глюкозо-6-фосфат играет роль аллостерического активатора, в то время как UDP-N-ацетилглюкозамин — ингибитор.

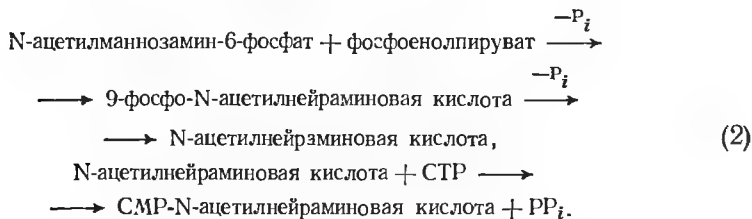
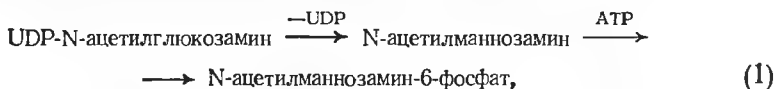
15.7.12. Образование сиаловых кислот

Сиаловые кислоты входят в состав гликопротеидов млекопитающих (обычно как нередуцирующие концевые остатки олигосахарида), гликофинголипидов и структур бактериальной стенки.

Как показано на рис. 15.12, синтез этих кислот начинается от UDP-N-ацетилглюкозамина и идет через N-ацетилманнозамин до N-ацетилманнозамин-6-фосфата. Альдегидный углерод последнего затем участвует в альдольной конденсации с фосфоенолпируватом, фосфат которого гидролитически отщепляется, вследствие чего процесс становится практически необратимым:



Получающаяся в результате гидролитического отщепления 9-фосфата N-ацетилнейраминовая кислота реагирует с СТР с образованием СМР-N-ацетилнейраминовой кислоты:



15.7.13. Механизм контроля взаимопревращений гексоз

В основном синтез других гексоз из глюкозы направлен в сторону соединений, требуемых для синтеза полисахаридов. Как уже отмечалось, многие, если не все, такого рода биосинтетические пути саморегулируются; активированная форма гексозы, которая

утилизируется при образовании полимера, выступает в качестве аллостерического ингибитора какой-нибудь ранней стадии своего собственного биосинтеза. В табл. 15.5 перечислены некоторые при-

Таблица 15.5

Примеры метаболического контроля биосинтеза гексоз ингибированием по типу обратной связи

Ингибитор ^а	Ингибируемая реакция ^б	Источник
dTDTрамноза	dTTP + глюкозо-1-P → dTDTглюкоза	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i>
CDРпаратоза	СТР + глюкозо-1-P → CDРглюкоза	<i>Salmonella paratyphi</i>
GDPфукоза	GTP + маннозо-1-P → GDPманноза	<i>E. coli</i>
CMP-Neu Ac	UTP + Ac-глюкозамин-1-P → UDP-Ac-глюкозамин	<i>E. coli</i>
CMP-Neu Ac	Ac-глюкозамин-6-P → Ac-маннозамин-6-P	<i>E. coli</i>
CMP-Neu Ac	UDP-Ac-глюкозамин → Ac-маннозамин	Печень, роговица
UDP-Neu Ac	Фруктозо-6-P + глутамин → глюкозамин-6-P	<i>E. coli</i> , печень
UDPксилоза	UDPглюкоза → глюкуроновая кислота	<i>E. coli</i> , печень

^а NeuAc — N-ацетилнейраминная кислота.

^б Ac — N-ацетил.

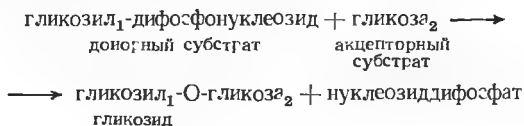
меры метаболического контроля такого типа. Специфичность таких процессов иллюстрируется тем фактом, что некоторые штаммы *Aerobacter* используют маннозу, а другие — фукозу в построении своих внеклеточных полисахаридов; действие GDPманнозопирозифосфорилазы ингибируется GDPманнозой у бактерий первой группы и GDPфукозой — у второй, но не наоборот.

15.8. Биосинтез гликозидов

15.8.1. Гликозилтрансферазы и типы гликозидных связей

Синтез гликозидов происходит во всех живых клетках. Поскольку гидролиз какого-нибудь простого гликозида, например мальтозы, сопровождается изменением свободной энергии $\Delta G^\circ = -4000$ кал/моль, то образование гликозидной связи возможно

только при обеспечении требуемым количеством энергии. Эта энергия становится доступной для синтеза путем утилизации нуклеозидфосфосахаров в качестве донорных субстратов в реакциях, катализируемых *гликозилтрансферазами*



Аномерный углерод гликозы в донорном субстрате всегда связан с фосфатом так же, как в UDPглюкозе (разд. 15.3.8). Некоторые типы гликозидных связей, найденные у млекопитающих и представляющие собой результат действия гликозилтрансферазы, перечислены в табл. 15.6. Лишь немногие из этих дисахаридов найдены в природе; один из наиболее важных дисахаридов для млекопитающих — лактоза молока, синтез которой при участии лактозосинтазы рассмотрен в гл. 8. Все другие гликозиды у высших организмов обычно содержат более двух моносахаридов и связаны с белком или липидом.

Олигосахариды тканей млекопитающих обычно образуются путем соответствующей комбинации небольшого числа моносахаридов, а именно фукозы, галактозы, N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина, маннозы и сиаловой кислоты (N-ацетил или N-гликолил). Глюкоза редко встречается в составе олигосахаридов гликопротеидов, и, за исключением коллагена (гл. 38), она находится преимущественно в гомоолигосахаридах, таких, как гликоген, крахмал и целлюлоза. Некоторые специализированные олигосахариды соединительной ткани содержат ксилозу, глюкуроновую кислоту, идуроновую кислоту и сульфаты N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина (гл. 38). Природа нуклеозида в донорном субстрате какой-либо гликозилтрансферазы меняется в зависимости от присутствующего моносахарида; так используются UDPпроизводные галактозы, N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина и глюкуроновой кислоты, в то время как для действия фукозил- и маннозилтрансфераз требуется участие GDPпроизводных фукозы и маннозы.

Точное строение образуемого какой-либо гликозилтрансферазой гликозида определяется ее строгой субстратной специфичностью. Так, каждая из 40 гликозидных связей в перечисленных в табл. 15.6 олигосахаридах млекопитающих образуется под действием специфической трансферазы. Известно по крайней мере шесть фукозилтрансфераз, восемь галактозилтрансфераз и т. д., и похоже на то, что в дальнейшем будут выявлены и другие ферменты по мере расширения наших сведений о сложной структуре связанных с белками олигосахаридов. Значительная вариабель-

Таблица 15.6

Главные типы гликозидных связей, найденные в олигосахаридах млекопитающих

Гликозидная связь ^a	Источник (только как пример)
Fuc(α 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc	IgG глобулин миеломы
Fuc(α 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc	То же
Fuc(α 1 $\rightarrow$ 2)Gal	Групповые вещества крови (гл. 32)
Fuc(α 1 $\rightarrow$ 3)Glc	Олигосахариды молока (человека)
Fuc(α 1 $\rightarrow$ 4)Man	Глобулины миеломы (гл. 30)
Fuc(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc	То же
Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc	Многие белки плазмы крови (гл. 29)
Gal(β 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc	То же
Gal(β 1 $\rightarrow$ 6)GlcNAc	■
Gal(β 1 $\rightarrow$ 3)GalNAc	Муцин (гл. 34)
Gal(β 1 $\rightarrow$ 4)GalNAc	Ганглиозиды (гл. 18)
Gal(β 1 $\rightarrow$ 6)GalNAc	Глобулины миеломы
Gal(α 1 $\rightarrow$ 4)Gal	Церамиды (гл. 18)
Gal(α 1 $\rightarrow$ 3)Gal	Церамиды
GalNAc(α 1 $\rightarrow$ 3)GalNAc	Групповые вещества крови
GalNAc(α 1 $\rightarrow$ 3)Gal	То же
GalNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal	Цитоплины
GalNAc(β 1 $\rightarrow$ 4)Gal	Ганглиозиды
GalNAc(β 1 $\rightarrow$ 4)GalNAc	Глобулины миеломы
Glc(α 1 $\rightarrow$ 2)Gal	Коллаген (гл. 38)
GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Gal	Групповые вещества крови
GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 4)Gal	Ганглиозиды
GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 2)Man	Гликопротеиды плазмы крови (гл. 29)
GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 3)Man	То же
GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 4)Man	»
GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc	»
GlcNAc(β 1 $\rightarrow$ 6)Gal	Групповые вещества крови
Man(α 1 $\rightarrow$ 6)Man	Глобулины миеломы
Man(α 1 $\rightarrow$ 4)Man	Белки плазмы крови
Man(α 1 $\rightarrow$ 3)Man	Глобулины миеломы
Man(α 1 $\rightarrow$ 2)Man	То же
Man(α 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc	»
Man(α 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc	»
Man(β 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc	Овальбумин
NeuAc(α 2 $\rightarrow$ 3)Gal	Белки плазмы крови
NeuAc(α 2 $\rightarrow$ 4)Gal	Иммуноглобулины
NeuAc(α 2 $\rightarrow$ 6)Gal	Белки плазмы крови
NeuAc(α 2 $\rightarrow$ 6)GalNAc	Муцины
NeuAc(α 2 $\rightarrow$ 8)NeuAc	Ганглиозиды
NeuAc(β 2 $\rightarrow$ 8)NeuAc	»

^a NAc — N-ацетил.

ность гликозидных связей объясняется специфическим образованием как α -, так и β -связей с каждой из многочисленных гидроксидных групп, доступных для взаимодействия на акцепторных гликозосубстратах.

Все гликозидные связи, перечисленные в табл. 15.6, расщепляются гликозидазами, многие из которых найдены в лизосомах млекопитающих (разд. 11.3.3). Некоторые гликозидазы выделяются бактериями и, вероятно, предназначены для того, чтобы расщеплять сложные олигосахариды, используемые в качестве источника питания. Независимо от источника каждая гликозидаза обладает строгой субстратной специфичностью, гидролизуя лишь одну или ограниченное число гликозидных связей. Это свойство делает гликозидазы особенно полезным инструментом в структурном анализе олигосахаридов.

15.8.2. Биологическая роль олигосахаридов

Биологическая роль некоторых олигосахаридов, в том числе гомополисахаридов глюкозы, совершенно ясна; гликоген и крахмал выступают в качестве энергетического резерва, целлюлоза — в качестве основного структурного вещества растений. Кроме того, некоторые олигосахариды формируют главный структурный компонент бактериальной клеточной стенки (разд. 15.9), а олигосахариды белков плазмы крови важны для процесса обновления плазматических белков (гл. 29). Наряду с этим множественность моносахаридов и разнообразие связей между ними в олигосахаридах позволяют предположить, что эти макромолекулы потенциально несут обширную информацию. Экспериментальные доказательства в пользу биологической утилизации этой информации только что начинают собираться. Оказалось, что олигосахариды поверхности клетки, ковалентно связанные с белками или липидами, могут способствовать реализации разнообразных проявлений жизнедеятельности клетки. Если клетки в культуре тканей обрабатывают специфической гликозидазой, удаляющей один моносахарид, то могут меняться такие свойства, как межклеточная адгезия и клеточное слияние. У лимфоцитов, обработанных растительными *лектинами* — белками, которые связываются со специфическим моносахаридом на нередуцирующем конце олигосахарида, — в местах высокой концентрации лектиновых рецепторов происходит образование дискретных зон; кроме того, на полюсах клетки формируются своеобразные структуры, напоминающие «шапочки» (кэппинг-эффект, гл. 30). Указанные процессы стимулируют огромное число молекулярных реакций, ведущих к клеточному делению или клеточной трансформации. Правда, в настоящее время найдено лишь небольшое число лектинов млекопитающих, биологические свойства которых идентичны их растительным аналогам. Некоторые

лектины млекопитающих обнаружены в повышенных количествах в тканях зародыша и тканях плода, что указывает на возможность их участия в процессе узнавания клетки клеткой и в формировании органов в процессе развития.

15.8.3. Синтез гетероолигосахаридов в гликопротеидах и гликолипидах

Для понимания процесса биосинтеза гетероолигосахарида следует прежде всего выяснить его структуру. Поскольку методы для анализа последовательности в олигосахаридах еще не разработаны столь хорошо, как соответствующие методы для изучения белков и полинуклеотидов, удалось установить полную структуру относительно малого числа олигосахаридов и подробные картины их биосинтеза только еще начинают проясняться.

В гликопротеидах обнаружены два главных типа олигосахаридных цепей; одни образуют О-гликозидную связь с гидроксидной группой либо серина, либо треонина, а другие — N-гликозидную связь с β -амидным азотом аспарагина. Типичные олигосахаридные цепи для обеих групп приведены в табл. 15.7. Каждая цепь синтезируется путем реакций, идущих с участием гликозилтрансфераз, но несколько различными путями.

Биосинтез пентасахаридной простетической группы муцина (гл. 34) подчелюстной слюнной железы свиньи приведен в качестве примера синтеза полисахарида, присоединенного к белку О-гликозидной связью (рис. 15.13). Вначале происходит встраивание N-ацетилгалактозамина в О-гликозидную связь с треонином или серином при помощи трансферазы, использующей UDP-N-ацетилгалактозамин в качестве донорного субстрата. Синтез пентасахарида завершается в результате последовательного действия галактозилтрансферазы, сиалилтрансферазы, фукозилтрансферазы и, наконец, еще одной N-ацетилгалактозаминилтрансферазы. Остается неясным, встраивается ли сначала сиаловая кислота или фукоза и не происходит ли в действительности в какой-либо популяции растущего полисахарида изначального встраивания и того и другого компонента. Однако завершающая процесс UDP-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза (стадия 5) не может действовать, если не образована фукозил- α -1,2-галактозильная связь. Каждая из пяти гликозилтрансфераз связана с мембранами аппарата Гольджи слюнных желез, и совместно они завершают синтез муцина после того, как было синтезировано белковое ядро на шероховатой эндоплазматической сети, но до момента начала секреции муцина.

В отличие от синтеза белков и полинуклеотидов синтез олигосахаридов часто остается незавершенным. Это находит свое отражение в том, что муцин свиньи может иметь неполные углевод-

Таблица 15.7

Структура некоторых олигосахаридных групп в гликопротеидах

Белок	Структура олигосаарида
Овальбумин ^а (яйце- вод курицы и белок яйца)	$ \begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow \text{Man}\alpha 1 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow \text{Man}\alpha 1 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}-\text{Asn} \end{array} $
IgA иммуноглобулин ^б (человека)	$ \begin{array}{c} \text{NeuAc}(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{Gal}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}(\beta 1 \rightarrow 2)\text{Man}\alpha 1 \\ \text{NeuAc}(\alpha 2 \rightarrow 6)\text{Gal}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}(\beta 1 \rightarrow 2)\text{Man}\alpha 1 \end{array} \begin{array}{c} \text{Man}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}-\text{Asn} \end{array} $
Муцин поджелудочной железы ^а (свиньи; спе- цифичность к А+- групповым веществам крови)	$ \begin{array}{c} \text{GalNAc}(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Gal}(\beta 1 \rightarrow 3)\text{GalNAc}-\text{O-Ser или Thr} \\ \text{Fuc} \quad \alpha 1 \quad \alpha 2 \quad \text{NeuAc} \end{array} $

^а У нередуцирующих концевых остатков маннозы присутствуют различные количества N-ацетилглюкозамина.

^б Этот иммуноглобулин содержит олигосахариды, структура которых лишь незначительно (некоторыми деталями) отличается от приведенной.

^в Сиаловая кислота (NeuAc) в основном представляет собой N-гликолилейаминовую кислоту (гл. 2).

ные простетические группы, с различными количествами моно-, ди-, три- и тетрасахаридов, которые являются промежуточными продуктами в синтезе муцина (рис. 15.13).

Синтезы других олигосахаридов с О-гликозидной связью в гликопротеидах изложены в других разделах (о групповых веществах крови см. гл. 32; о хондроитинсульфатах см. гл. 38). Подобно синтезу муцина, они включают последовательное действие ряда специфических гликозилтрансфераз. Мало известно о регуляции биосинтеза олигосахаридов. Предполагается, что порядковое место каждого сахара в цепи детерминируется заранее потому, что только те гликозилтрансферазы, которые требуются для синтеза олигосахарида, присутствуют в клетках, способных синтезировать дан-

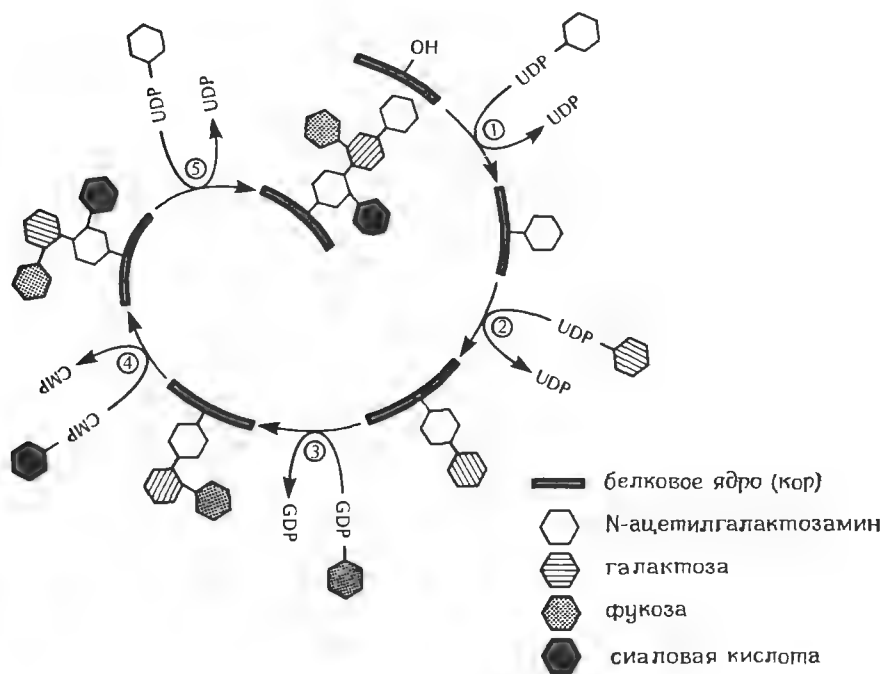
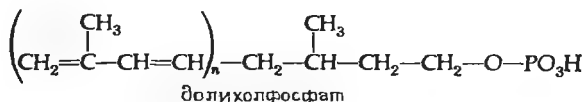


Рис. 15.13. Схема биосинтеза муцина подчелюстной железы свиньи с активностью A^{+} -групповых веществ крови (гл. 29). Моносахариды показаны в виде шестиугольников. Участвующие гликозилтрансферазы: на стадии 1 UDP-N-ацетилгалактозамина — протеин-UDP-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза; на стадии 2 UDPгалактозы — $\beta(1 \rightarrow 3)$ -N-ацетилгалактозамин-галактозилтрансфераза; на стадии 3 GDPфукозы — $\alpha(1 \rightarrow 2)$ -галактозо-фукозилтрансфераза; на стадии 4 CMPсиаловой кислоты — $\alpha(2 \rightarrow 6)$ -N-ацетилгалактозамин-сиалилтрансфераза и на стадии 5 UDP-N-ацетилгалактозамина — $\beta(1 \rightarrow 3)$ -галактозо-N-ацетилгалактозаминилтрансфераза.

ный конкретный олигосахарид. Это трудно согласовать с тем фактом, что в некоторых клетках найдены гликозилтрансферазные активности, которые, очевидно, не имеют отношения к синтезу известных в настоящее время гликопротеидов, образующихся в этих клетках.

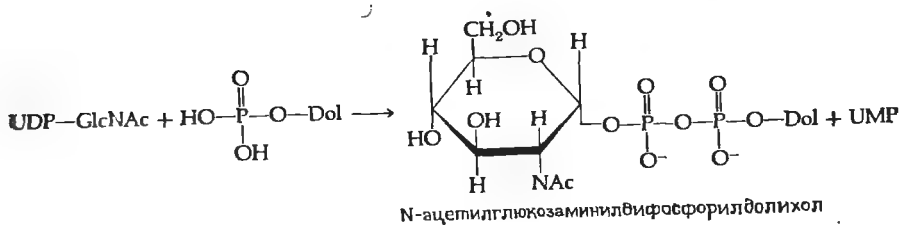
Синтез олигосахаридов, соединенных N-гликозидной связью, включает углеводный интермедиат долихолфосфата, который сохраняет связь с мембраной эндоплазматического ретикула или аппарата Гольджи на протяжении всего процесса

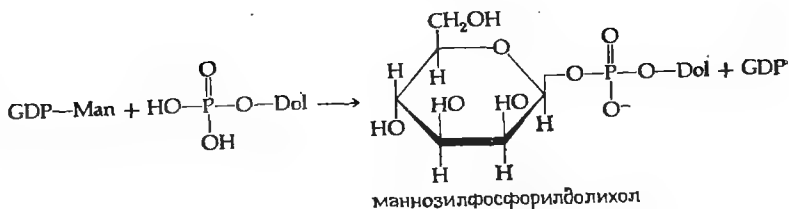


Долихолы — это полипренолы (от C₈₀ до C₁₀₀), содержащие от 16 до 20 изопреновых единиц; конечная изопреновая единица насыщена и заканчивается гидроксильной группой. Небольшое количество подобного C₅₅-полипренола найдено в печени; этот полипренол участвует и в синтезе олигосахаридов бактериальной клеточной стенки (разд. 15.11). Около половины долихола в печени присутствует в виде эфира пальмитиновой кислоты, который синтезируется путем переноса с фосфатидилхолина.

Участие долихолфосфатов в синтезе олигосахаридов в высших организмах отмечалось в связи с обнаружением свойства микросомальных препаратов из различных тканей, включая печень, мозг, яйцевод, щитовидную железу и лимфоциты, образовывать долихолфосфосахара при инкубации с долихолфосфатом и каким-либо нуклеотидсахаром. К числу нуклеотидсахаров, способность которых к образованию долихолфосфосахаров установлена, относятся GDPманноза, UDP-N-ацетилглюкозамин, UDPглюкоза и UDPксилоза.

Маннозилные и N-ацетилглюкозаминильные производные долихолфосфата синтезируются в соответствии с приведенными ниже реакциями (Dol—O—PO₃H—долихолфосфат):





Отметим, что с N-ацетилглюкозаминном образуется α -дифосфорильное производное, а с маннозой — β -монофосфорильное.

Обнаружены также ди-, три- и олигогликозилфосфорилдолихолы. Так, продукт, содержащий маннозу и N-ацетилглюкозамин, изолированный из яйцевода курицы, имел ориентировочную структуру $(\text{Man})_n\alpha\text{-Man}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}$ -дифосфорилдолихол. Похожее соединение было выделено из клеток мышинной миеомы: $(\text{Man})_5\text{-(GlcNAc)}_2$ -дифосфорилдолихол.

Из этих и других наблюдений становится очевидным, что олигосахаридная цепь сначала синтезируется на долихолфосфате и затем переносится в неизменном виде на специфический остаток аспарагина в акцепторном белке (рис. 15.14). Несмотря на то что ни одна из специфических трансфераз, участие которых постулируется в этих реакциях, не была изолирована, имеются серьезные экспериментальные свидетельства в пользу этой концепции. В частности, показано, что антибиотик *туникамицин* преимущественно ингибирует синтез N-ацетилглюкозаминилдифосфорилдолихола в препаратах микросом, что находится в соответствии с имеющимися наблюдениями о полном подавлении этим антибиотиком синтеза олигосахаридов, присоединенных N-гликозидной связью в гликопротеидах.

Имеющиеся в настоящее время данные позволяют полагать, что реакции, идущие с участием долихолфосфата (рис. 15.14), ответственны за синтез и встраивание «ядра» («кора») олигосахарида в гликопротеиды, причем углеводные группы присоединяются N-гликозидными связями. Ядро характеризуется тем, что содержит маннозу и N-ацетилглюкозамин; гликопротеиды с такими структурами ядра часто обозначают как гликопротеиды *плазменного типа*, поскольку многие плазмы крови имеют олигосахаридные простетические группы этого типа (гл. 29). Кор-структуры содержат варьирующие количества маннозы (табл. 15.6) у различных гликопротеидов, но причины таких вариаций неясны.

После завершения синтеза области ядра гликопротеида олигосахаридные цепи достраиваются под действием гликозилтрансфераз без участия долихолфосфата. Например, для завершения синтеза олигосахарида IgA (табл. 15.6) требуется последовательное действие по меньшей мере трех гликозилтрансфераз: вначале

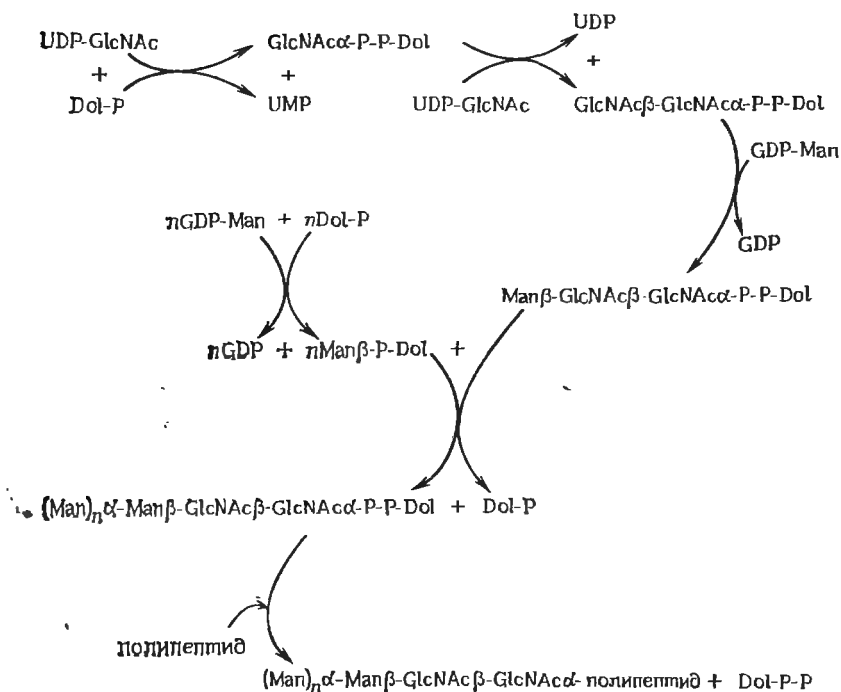


Рис. 15.14. Предложенная последовательность для биосинтеза олигосахаридного ядра (кора), соединенного N-гликозидной связью с остатками аспарагина, в гликопротеидах. Этот путь предложен на основе изучения процесса в печени, поджелудочной железе, яйцевом и лимфоцитах. Принимают, что определенная гликозилтрансфераза действует на каждой стадии и специфична к катализируемой реакции. [Wacheter C. J., Lennarz W. J., Annu. Rev. Biochem., 45, 105, 1976.]

UDP-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы, затем UDPгалактозилтрансферазы и, наконец, СМРсналилтрансферазы.

Уже давно известно, что недостаточность витамина А (ретинола) нарушает функционирование слизистой оболочки кишечника и связана с уменьшением числа бокаловидных клеток. У таких тканей *in vitro* обнаруживается существенное снижение встраивания фукозы и N-ацетилглюкозамина в эндогенные акцепторы. Эти факты послужили основанием для предположения о том, что ретинол может выполнять функцию, аналогичную функции долихолфосфата. Четких доказательств в пользу этого предположения не имеется; однако сообщается, что ретинолфосфат может служить акцептором маннозильных остатков в препаратах мембран печени крысы.

15.9. Клеточные стенки растений

Физические трудности у растительных клеток несравненно более серьезны, чем у клеток животных. Растительные клетки могут попадать в экстремально гипотонические условия, когда они обитают в пресноводном водоеме, или в экстремально гипертонических условиях, если средой их обитания является океан. У высших растений механизмы транспорта жидкости и электролитов зависят от развития тургора в клетках проводящих тканей. В отсутствие минерального скелета материал, окружающий клетки наземных растений, должен быть способен выдерживать большую массу. Эти проблемы разрешаются путем выделения мембранной растительной клетки целлюлозы, организованной в плотно упакованные фибриллы, по существу образующие кристаллическую решетку. Такие фибриллы, оплетающие и укрепляющие клетку, окружены аморфным матриксом других полисахаридов. Это сложная и очень разнообразная группа веществ, обладающих видовой специфичностью. Наиболее распространены *гемицеллюлозы*, которые представляют собой ксиланы — линейные полимеры D-ксилозы, соединенной β -1,4-связью с боковыми цепями, построенными из 4-О-метилглюкуроновой кислоты и/или арабинозы. Гемидцеллюлозам в матриксе сопутствуют, но не связаны с ними пектины — полимеры метиловых эфиров галактуроновой кислоты. У отдельных видов растений в этот матрикс могут также выделяться D-галактаны, L-арабианы или различные гетерогликаны.

В тесном контакте с целлюлозными фибриллами матрикса находится значительное количество (возможно, 5% сухой массы) белка, называемого *экстенсином*. Подобно коллагену, этот белок богат оксипролином, доля которого составляет $1/5$ числа всех аминокислотных остатков. Как и в синтезе коллагена (гл. 38), гидроксирование пролина происходит после его встраивания в пептидную цепь. Остатки арабинозы или галактозы гемицеллюлозных молекул соединены гликозидной связью со многими из этих гидроксидных групп. Образование и ориентация экстенсина, который существует в виде жесткой закрученной влево спирали, может определять рост и направление полисахаридных волокон. Структурная мощность такой упаковки в некоторых случаях позволяет противостоять столь большой осмотической силе, как 20 000 кг/см².

Клеточные стенки водорослей, грибов, плесеней и дрожжей не должны выдерживать столь значительную массу, но опять-таки должны быть способны противостоять большим разностям осмотического давления. У этих организмов также наблюдается значительное разнообразие материалов стенки, представленных гомо- и гетерополисахаридами. У всех грибов и у некоторых дрожжей в структуру клеточной стенки включен хитин; компонентами клеточной стенки дрожжей являются сильно разветвленные полиманнаны. Стенки водорослей наряду с другими компонентами содержат большие количества полиманнуриновых (альгиновых) кислот. Сведения о структуре многих растительных полисахаридов еще недостаточны, мало известно об их синтезе, но ясно, что они определяют размер, форму и физические свойства клеток.

15.10. Структура полимеров бактериальных клеточных стенок

15.10.1. Пептидогликан

Механическое укрепление клеток бактерий сопряжено с еще большими затруднениями, чем в случае клеток растений. И здесь клетка должна иметь возможность противостоять внезапному осмотическому «шоку», но вместе с тем клеточная стенка должна быть способной расти вместе с клеткой, разрываться в соответствующий момент клеточного деления и после этого быстро замыкаться. Та-

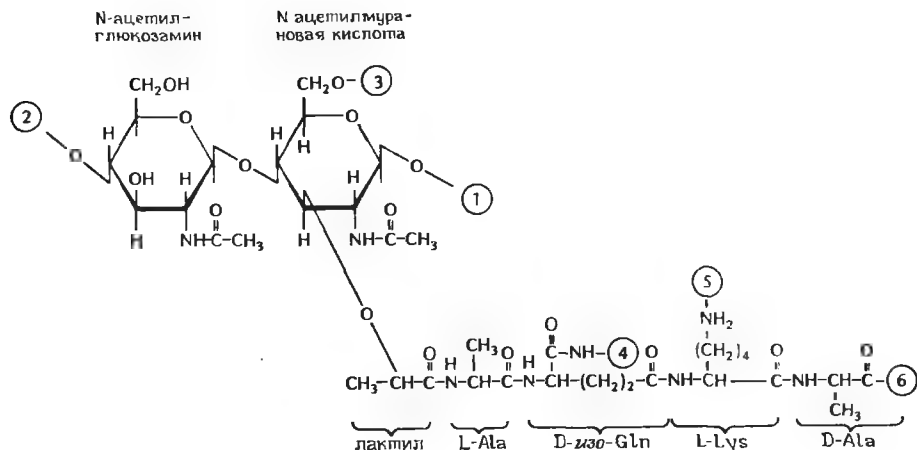


Рис. 15.15. Повторяющаяся единица пептидогликана клеточных стенок бактерий. Цифры в кружках указывают группы, участвующие в присоединении одной повторяющейся единицы к другой или к другим заместителям: 1 и 2 — присоединены к полисахаридным цепям; 3 — может быть связана с тейхоевой кислотой (см. ниже) через фосфодиэфирный мостик; 4 — обычно атом Н, но иногда он участвует в образовании пептидной связи с другой аминокислотой; 5 — соединение с пептидной связью (6) в различных повторяющихся единицах, чаще через короткую пептидную цепь.

кой каркас клетки в действительности представляет собой одну мешковидную макромолекулу, а именно *пептидогликан*, часто называемый *мурамином*, который обязательно присутствует в бактериях, причем его структура может несколько варьировать в зависимости от вида бактерий. Повторяющаяся единица пептидогликана показана на рис. 15.15. Гликановая единица построена из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты (3-О-лактил-N-ацетилглюкозамин, сокращенно Mur NAc), и пептидная единица состоит из L- и D-аланина, L-лизина и D-изоглутамин в указанной последовательности. Отмечена значительная видовая вариабельность состава пептидной единицы; так, например, мезодиаминопимелиновая кислота (разд. 20.4.1.9) заменяет L-лизин у *E. coli*. На рис. 15.16 показаны основные черты строения образуемой поперечными связями сети повторяющихся единиц пептидогликана *Staphylococcus aureus* и *E. coli*. Отметим, что с мезодиаминопимелиновой кислотой может быть ковалентно связан липопептид (разд. 17.3). Кроме того, у *S. aureus* единицы пептидогликана связаны пентаглициновыми мостиками. У многих организмов, таких, как *Micrococcus lysodeikticus*, лишь приблизительно к одной из каждых пяти групп N-ацетилмурамовой кислоты в повторяющемся дисахариде гликана присоединен тетрапептид, что приводит к созданию более открытого полимера пептидогликана в сравнении с таковым *E. coli* или *S. aureus*.

Большую помощь в проведении структурного анализа пептидогликанов оказало применение гликозидаз и протеаз, гидролизующих какую-либо определенную связь в этих соединениях. Так, особенно полезной оказалась гликозидаза лизоцим, поскольку она гидролизует β -1,4-гликозидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином у грамположительных бактерий, таких, как *M. lysodeikticus*.

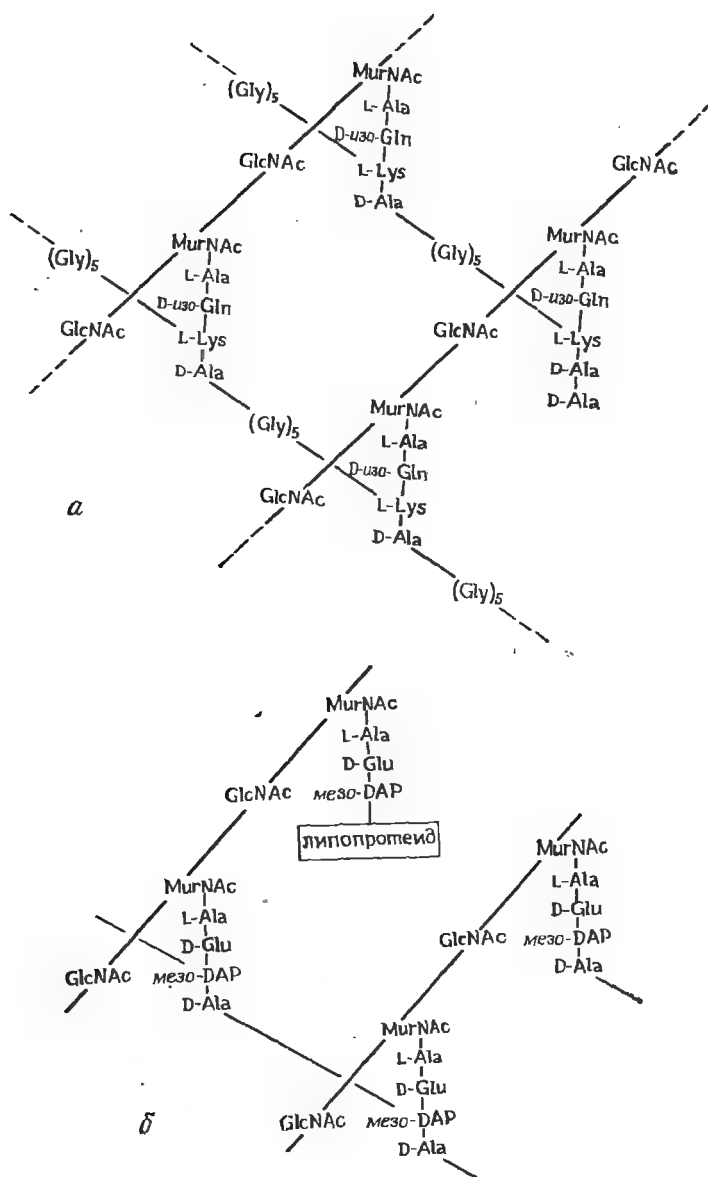


Рис. 15.16. Структура пептидогликанов из *Staphylococcus aureus* (а) и *E. coli* (б). Показанные структуры представляют лишь части макромолекулярной трехмерной сети в полимерной молекуле, в которую, по существу, заключена клетка. Цепи дисахаридных повторяющихся единиц упакованы в двух плоскостях и соединены поперечно пептидными связями, образующимися между пептидными единицами пептидогликана.

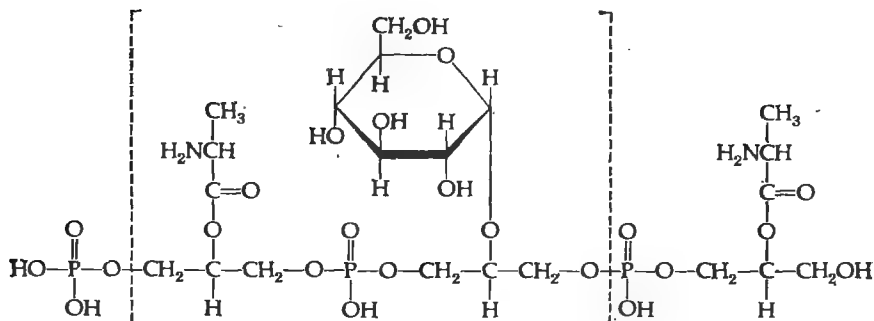


Рис. 15.17. Предполагаемая структура тейхоевой кислоты у одного из представителей *Lactobacillus*.

15.10.2. Тейхоевые кислоты

Поверхностные структуры всех грамположительных организмов содержат *тейхоевые кислоты*; последние включают остатки глицерина или рибита, связанные друг с другом фосфодиэфирными мостиками, и определяют многие специфические биологические свойства организма. Чаще всего гидроксидная группа во 2-м положении глицерина в тейхоевых кислотах мембран этерифицируется аланином, как, например, у *Lactobacillus arabinosis*, *Streptococcus lactis* и *Staphylococcus aureus*, но бывает, что она соединяется β -гликозидной связью с N-ацетилглюкозаминном (*S. aureus*) и другими моносахаридами. Структура типичной тейхоевой кислоты изображена на рис. 15.17. Имеются убедительные доказательства, что тейхоевые кислоты образуют фосфодиэфирные связи с C-6 N-ацетилмурамовой кислоты пептидогликана многих бактерий. В связи с большой вариабельностью структуры тейхоевых кислот эти соединения наделены рядом разнообразных физических свойств, получающих отражение в «жесткости» или «ослизненности» микроорганизма.

15.10.3. Липополисахариды

Электронно-микроскопические исследования позволили обнаружить, что поверхностные слои клеток *E. coli* и других грамотрицательных организмов образуют сложную оболочку, где тонкий слой пептидогликана разделяет внутреннюю цитоплазматическую мембрану и многокомпонентный наружный слой, который включает липополисахарид, белок и фосфолипид, и по своей структуре напоминает мембрану. В результате расщепления пептидогликана обработкой клеток лизоцимом получается *сферопласт*, который сохраняет внутреннюю и наружную мембраны. Внутренняя мембрана имеет типичную бислойную структуру, как в клетках зукариот; более плотная наружная мембрана несет в себе антигенные детерминанты, характерные для данного организма, включая O-антигены, которые могут быть сильно токсичными для животных. Липополисахариды грамотрицательных бактерий структурно организованы, по-видимому, так, как это показано на рис. 15.18. Периферическая часть липополисахаридов содержит O-антигенные детерминанты; они включают тетра- или пентасахаридные повторяющиеся единицы, которые связываются с образованием полисахаридов с очень большой молекулярной массой. Известно несколько сотен вариантов с серологической спе-

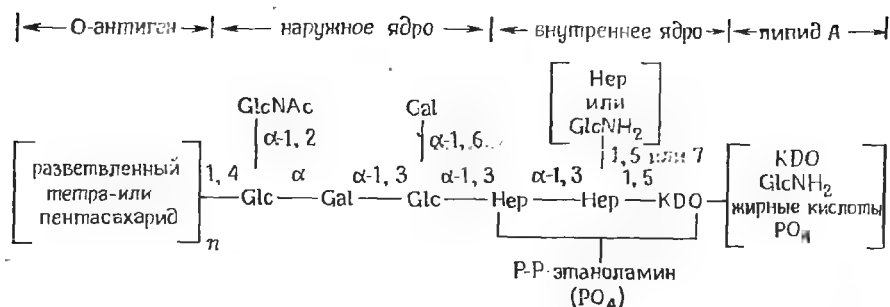


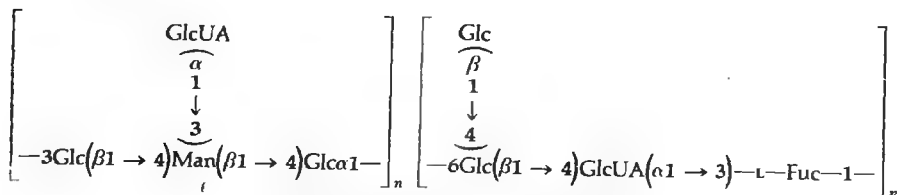
Рис. 15.18. Структурная организация липополисахарида грамотрицательных бактерий. Нер — гептулоза и КДО — 2-кето-5-дезоксиктулозоновая кислота.

цифичностью для О-антигена, и в соответствии с этим у О-антигенных полисахаридов наблюдается большое разнообразие состава углеводов. Наружное ядро липополисахарида относительно единообразно по структуре у различных видов *Salmonella* и служит для связывания О-антигенных детерминантов с внутренним ядром, построенным главным образом из гептозы и октулозоновой кислоты (2-кето-3-дезоксиктулозоновая кислота). Самая внутренняя *липид-А*-структура содержит N-ацетилглюкозамин, фосфат, насыщенные жирные кислоты и β-оксикислоты, такие, как β-оксимиристиновую кислоту, которая может быть связана с глюкозаминном амидной связью.

На наружной поверхности грамотрицательных организмов также имеются липопотеиды, которые ковалентно связаны с пептидогликаном (рис. 15.16). Они соединяются с мезодиаминопимелиновой кислотой через остатки лизина и аргинина липопотеида.

15.10.4. Капсулярные полисахариды

Многие грамотрицательные бактерии продуцируют на наружной стороне клеточной стенки полисахариды, отличные от тех, которые обсуждены выше. Они часто образуют рыхло связанные слизистые капсулы, как у *Klebsiella*, и могут быть выделены в среду при выращивании культуры. Этим полисахаридам также свойственны внутриродовые и межродовые структурные вариации. Два капсулярных полисахарида у *Aerobacter aerogenes* содержат следующие повторяющиеся тетрасахариды:



15.1.1. Биосинтез полимеров бактериальной клеточной стенки

Сложные олигосахариды клеточной стенки не являются метаболически инертными веществами, которые лишь обеспечивают образование жесткой капсулы бактериальной клетки. Для этих веществ показаны высокие скорости обмена, по

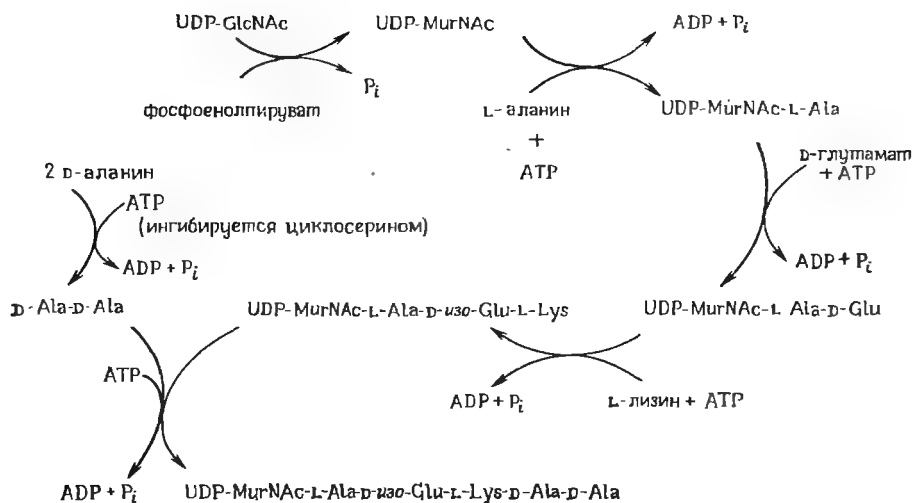
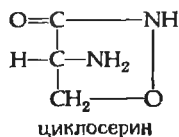
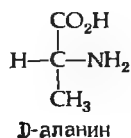


Рис. 15.19. Биосинтез N-ацетилмурамилпептида пептидогликана у *Staphylococcus aureus*. Процесс начинается синтезом UDP-GlcNAc и UDP-MurNAc, вслед за которым происходит последовательное присоединение пяти аминокислотных остатков в АТФ-зависимом процессе. Все реакции осуществляются на бактериальной мембране. Внутреннее ядро (кор) содержит О-пирофосфорилэтаноламин, который каким-то образом присоединен к углеводу и при гидролизе дает фосфат.

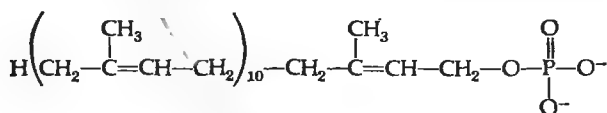
крайней мере в период логарифмического роста, и в их синтезе принимают участие разнообразные гликозилтрансферазы, подобные тем, которые имеются у высших организмов.

15.11.1. Синтез пептидогликана

Этот процесс осуществляется в три стадии: синтез пептидной единицы пептидогликана, синтез пептидогликановых повторяющихся единиц и связывание повторяющихся единиц поперечными мостиками для образования полисахарида клеточной стенки. На рис. 15.19 представлены реакции первой стадии, которая начинается синтезом N-ацетилмурамовой кислоты и затем идет с последующим наращиванием аминокислот в пептидной единице. Синтез D-аланил-D-аланина очень чувствителен к антибиотику циклосерину, который по своей структуре близок к D-аланину. На следующей стадии (рис. 15.20) N-ацетилмурамилпептид переносит-



ся на связанный в мембране липидный компонент, *ундекаprenилфосфат* — C₅₅-изо-пренол, близкий к долихолфосфату (разд. 15.8.3).



ундекаprenилфосфат

Пептидогликановый предшественник присоединяется к ундекапренолу через пирофосфатный мостик при C-1. В этой форме он сначала реагирует с UDP-N-ацетилглюкозаминном с образованием дисахаридпентапептида, все еще связанного с

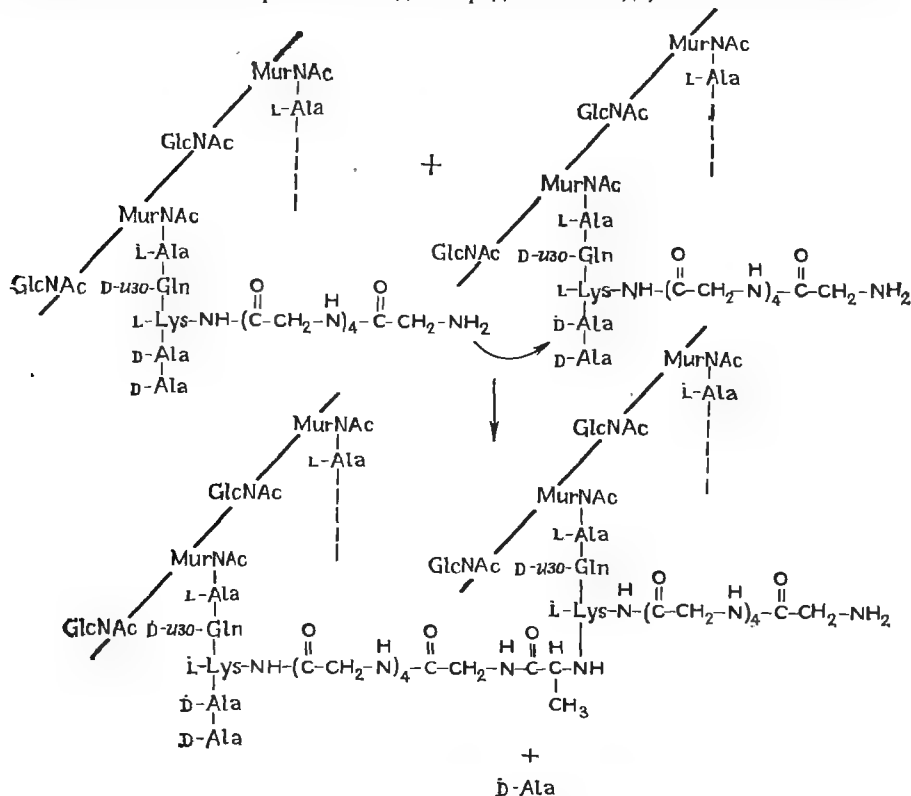
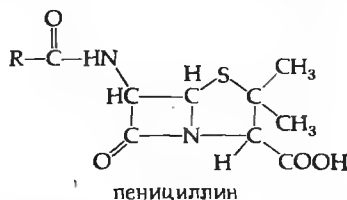


Рис. 15.21. Поперечная сшивка пептидогликановых повторяющихся единиц при образовании клеточных стенок бактерий. После встраивания N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмураминил-пептидилпептидогликана в растущий полисахарид клеточной стенки (рис. 15.18) возникают поперечные сшивки (как показано здесь для *Staphylococcus aureus*) между пептидными группами пептидогликана путем катализируемой ферментом реакции переамидирования, которая приводит к замещению остатка D-аланина на конце цепи соседней пептидогликановой повторяющейся единицы.

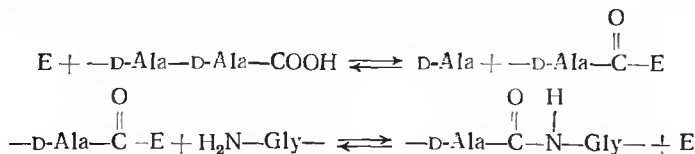
ундекапrenoлом. Затем в АТФ-зависимой реакции α -карбоксильная группа остатка D-глутаминовой кислоты амидируется с образованием остатка D-изоглутамина.

Для наращивания мостиковой единицы, как у *M. lysodeikticus* (рис. 15.16), совершается перенос пяти остатков глицина (одного за другим) от глицил-тРНК (гл. 26) сначала на α -аминогруппу лизинового остатка и затем на аминогруппу предшествующего глицина. Когда утилизируются другие аминокислоты, для образования мостиковой структуры они переносятся со своих соответствующих специфических тРНК. Однако фермент, ведущий процесс, специфичен к аминокислоте, а не к ее тРНК.

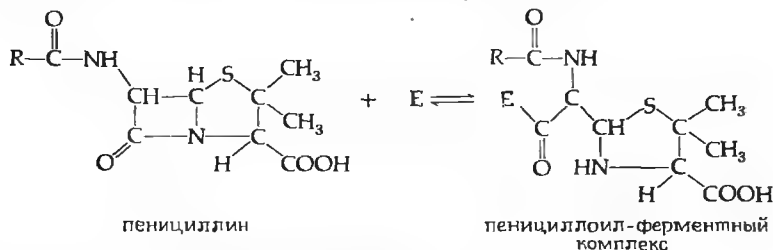
Конечная стадия синтеза пептидогликана состоит в реакции транспептидации, которая катализируется D-аланил-D-аланилкарбоксипептидазой (рис. 15.21). В этой стадии концевая аминогруппа цепи пентаглицина замещает D-аланин на концевой COOH-группе и образует пептидную связь между двумя цепями. Эта реакция тормозится пенициллином (ниже приводится общая структурная формула).



Если R — остаток бензила $C_6H_5CH_2-$, то антибиотик представляет собой бензилпенициллин, широко применяемый в терапии. Полагают, что пенициллин необратимо подавляет карбоксипептидазу, образуя с ней пенициллоил-ферментный комплекс. Обычно реакция транспептидации происходит с образованием D-аланил-ацил-ферментного комплекса в качестве промежуточного продукта.



Пенициллин по структуре напоминает D-аланил-D-аланин; поскольку он представляет собой циклический пептид, состоящий из двух аминокислот (D-валина и L-пистейна), то связывается с активным центром, образуя пенициллоил-ферментный ковалентный комплекс, подобный комплексу L-аланил-фермент.



Пептидная связь в пенициллине, разрывающаяся при ацилировании, значительно более реакционноспособна, чем соответствующая связь в D-аланил-D-аланине, из-за напряженности в четырехчленном кольце. У млекопитающих неизвестна какая-

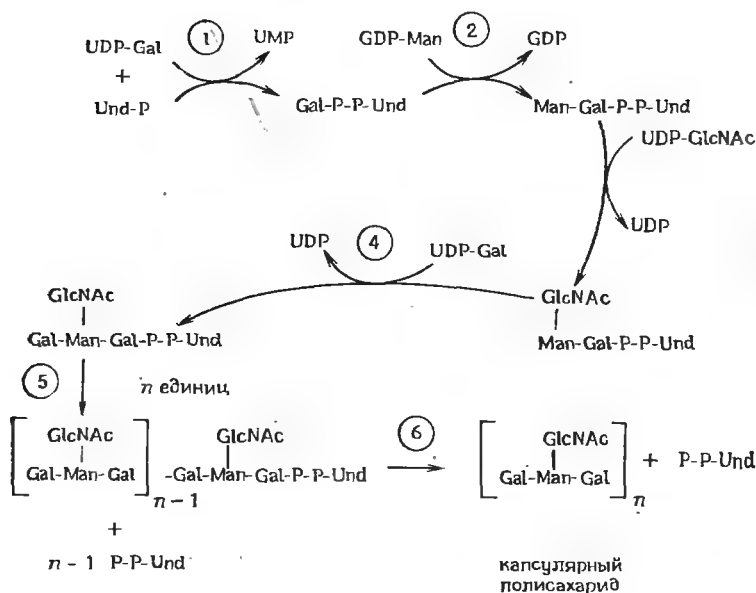
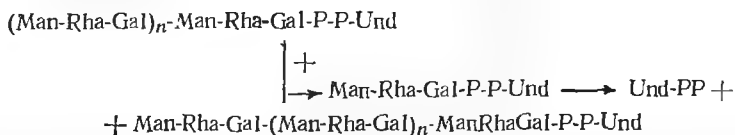


Рис. 15.22. Путь синтеза капсулярного полисахарида у *Aerobacter aerogenes*. Конечный продукт представляет собой полимерный полисахарид, содержащий n единиц повторяющегося тетрасахарида, который синтезируется в реакциях 1 и 5. Und-P — ундекапренилфосфат.

либо реакция, аналогичная ингибируемой пенициллином; этим объясняется высокая эффективность пенициллина как антибактериального агента, поскольку довольно большие его количества терапевтически переносятся без ущерба для эукариотного организма, но являются летальными для паразитирующего инфекционного микроорганизма. Антибиотики, иные, чем циклосерин и пенициллин, ингибируют процесс сборки пептидогликановых повторяющихся единиц при образовании полимера клеточной стенки бактерий. Ванкомицин и ристоцетин приписывают ингибирование включения ундекапренилфосфорилсахарных промежуточных продуктов в пептидогликан. Предполагают, что бацитрацин ингибирует дефосфорилирование ундекапренилпирофосфата в стадии 6 (рис. 15.20).

Тейхоевые кислоты синтезируются мембранно-связанными ферментами, в результате совместного действия которых образуется CDPрибит или CDPглицерин. Полимеразы затем катализируют образование полимеров глицерин- и рибитфосфатов, и моносахаридные группы вводятся гликозилтрансферазами при наличии соответствующего UDPмоносахарида как донора субстрата. Капсулярные полисахариды грамотрицательных бактерий также синтезируются путями, зависящими от ундекапренилфосфата. Биосинтез капсулярного полисахарида у *Aerobacter aerogenes* показан на рис. 15.22. Образование O-антигенов липополисахаридов грамотрицательных бактерий также происходит по пути, зависящему от ундекапренилфосфата, как это показано для одного типа антигена *Salmonella typhimurium* (рис. 15.23). Они в конечном итоге присоединяются к обращенным наружу единицам ядра (рис. 15.18) под действием специфических трансфераз и полимеризуются, давая макромолекулярные O-антигены. Полимеризация O-антигенных повторяющихся единиц происходит путем переноса преобразованных единиц по-

лимера к нередуцирующему концу повторяющейся единицы ундекапренилдифосфила (см. ниже):



Область наружного ядра липополисахарида также синтезируется путем гликозилтрансферазных реакций. Эти трансферазы, по-видимому, связываются с высокоорганизованными комплексами липополисахаридов и фосфатидилэтаноламина, присутствие которых требуется для проявления трансферазной активности. Так, высокоочищенная галактозилтрансфераза из *S. typhimurium*, которая встраивает галактозу в наружное ядро, активна только в присутствии липидов, включая липополисахариды и фосфатидилэтаноламин.

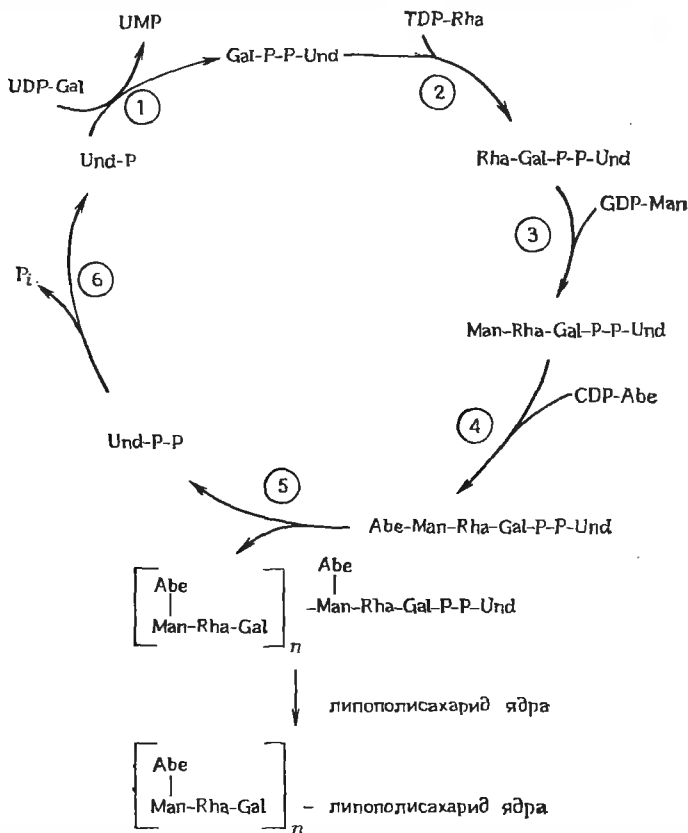


Рис. 15.23. Биосинтез одного типа О-антигенного детерминанта у *Salmonella typhimurium*. Und-P — ундекапренилфосфат, Rha — 1-рамноза (6-дезоксид-манноза) и Abe — абеквоза (3,6-дидезокси-Д-ксилогексоза).

ЛИТЕРАТУРА

Книги

- Aminoff D.*, ed., *Blood and Tissue Antigens*, Academic Press, Inc., New York, 1970.
- Goodwin T. W.*, ed., *Metabolic Roles of Citrate*, Academic Press, Inc., New York, 1968.
- Gottschalk A.*, ed., *The Glycoproteins: Their Composition, Structure and Function*, 2d ed., 2 vols., American Elsevier Publishing Company, Inc., New York, 1972.
- Hanson R. W., Mehlman M. A.*, eds., *Gluconeogenesis*, Wiley-Interscience, New York, 1976.
- Piras R., Pontis H. C.*, eds., *Biochemistry of the Glycosidic Linkage*, Academic Press, Inc., New York, 1972.
- Soling H. D., Williams B.*, eds., *Regulation of Gluconeogenesis*, Academic Press, Inc., New York, 1971.
- Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S.*, eds., *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 3d ed., McGraw-Hill Book Company, New York, 1972.

Обзорные статьи

- Anderson R. L., Wood W. A.*, Carbohydrate Metabolism in Microorganisms, *Annu. Rev. Microbiol.*, 23, 539—578, 1969.
- Atkinson D. E.*, Adenine Nucleotides as Stoichiometric Coupling Agents in Metabolism and as Regulatory Modifiers: The Adenylate Energy Charge, pp. 1—21, in: *H. J. Vogel*, ed., *Metabolic Regulation*, vol. 5, Academic Press, Inc., New York, 1971.
- Ballard F. J., Hanson R. W., Kronfeld D. S.*, Gluconeogenesis and Lipogenesis in Tissue from Ruminant and Nonruminant Animals, *Fed. Proc.*, 28, 218—231, 1969.
- Bonsignore A., De Flora A.*, Regulatory Properties of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase, *Curr. Top. Cell. Regul.*, 6, 21—62, 1972.
- Brown D. H., Brown B. I.*, Some Inborn Errors of Carbohydrate Metabolism, *MTP Int. Rev. Sci.*, (1), 5, 391—426, 1975.
- Clark M. G., Lardy H. A.*, Regulation of Intermediary Carbohydrate Metabolism, *MTP Int. Rev. Sci.*, (1) 5, 223—266, 1975.
- Everse J., Kaplan N. O.*, Lactate Dehydrogenases: Structure and Function, *Adv. Enzymol.*, 37, 61—134, 1973.
- Fisher E. H., Heilmeyer L. M. G., Jr., Hascke R. H.*, Phosphorylase and the Control of Glycogen Degradation, *Curr. Top. Cell. Regul.*, 4, 211—251, 1971.
- Frenkel R.*, Regulation and Physiological Functions of Malic Enzymes, *Curr. Top. Cell. Regul.*, 9, 157—181, 1975.
- Harris J. I., Waters M.*, Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase, pp. 1—49, in: *P. D. Boyer*, ed., *The Enzymes*, 3d ed., vol. XIII, Academic Press, Inc., New York, 1976.
- Heath E. C.*, Complex Polysaccharides, *Annu. Rev. Biochem.*, 40, 29—56, 1971.
- Hemming F. W.*, Lipids in Glycan Biosynthesis, *MTP Int. Rev. Sci.*, (1) 4, 39—97, 1974.
- Hers H. G.*, The Control of Glycogen Metabolism in the Liver, *Annu. Rev. Biochem.*, 45, 167—189, 1976.
- Hess B., Baileux A., Kruger J.*, Cooperation of Glycolytic Enzymes, *Adv. Enz. Regul.*, 7, 149—170, 1969.
- Horecker B. L., Melloni E., Pontremoli S.*, Fructose 1,6-Biphosphatase: Properties of the Neutral Enzyme and its Modification by Proteases, *Adv. Enzymol.*, 42, 193—226, 1975.
- Katz J., Rognstad R.*, Futile Cycles in the Metabolism of Glucose, *Curr. Top. Cell. Regul.*, 10, 237—289, 1976.
- Krebs E. G., Preiss J.*, Regulatory Mechanisms in Glycogen Metabolism, *MTP Int. Rev. Sci.*, (1) 5, 337—389, 1975.

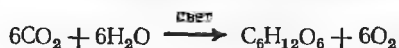
- Krebs H. A.*, The Pasteur Effect and the Relations between Respiration and Fermentation, *Essays Biochem.*, 8, 1—34, 1972.
- Lai C. Y., Horecker B. L.*, Aldolase: A Model for Enzyme Structure-Function Relationships, *Essays Biochem.*, 8, 149—178, 1972.
- Lampert D. T. A.*, The Protein Component of Primary Cell Walls, *Adv. Botan. Res.*, 2, 151—218, 1965.
- Lowenstein J. M.*, The Tricarboxylic Acid Cycle, pp. 146—270 in: D. M. Greenberg, ed., *Metabolic Pathways*, 3d ed., vol. 1, Academic Press, Inc., New York, 1967.
- Luderitz O., Staub A. M., Westphal O.*, Immunochemistry of the O and R Antigens of *Salmonella* and Related *Enterobacteriaceae*, *Bact. Res.*, 30, 192—255, 1966.
- Marshall R. D.*, Glycoproteins, *Annu. Rev. Biochem.*, 41, 673—702, 1972.
- Morrison J. F., Heyde E.*, Enzymic Phosphoryl Group Transfer, *Annu. Rev. Biochem.*, 41, 29—54, 1972.
- Moss J., Lane M. D.*, The Biotin-dependent Enzymes, *Adv. Enzymol.*, 35, 321—442, 1971.
- Nikaido H., Hassid W. Z.*, Biosynthesis of Saccharides from Glucopyranosyl Esters of Nucleoside Pyrophosphates, *Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.*, 26, 352—484, 1971.
- Osborne M. J.*, Structure and Biosynthesis of the Bacterial Cell Wall, 39, 501—538, 1969.
- Pontremoli S., Horecker B. L.*, Fructose 1,6-Diphosphatase of Rabbit Muscle, *Curr. Top. Cell. Regul.*, 2, 173—199, 1970.
- Ramaiah A.*, Pasteur Effect and Phosphofructokinase, *Curr. Top. Cell. Regul.*, 8, 297—345, 1974.
- Rose I. A.*, Mechanism of the Aldose—Ketose Isomerase Reaction, *Adv. Enzymol.*, 43, 491—518, 1975.
- Roseman S.*, The Transport of Carbohydrates by a Bacterial Phosphotransferase System, *J. Gen. Physiol.*, 54, 138s—184s, 1968.
- Ryman B. E., Whelan W. J.*, New Aspects of Glycogen Metabolism, *Adv. Enzymol.*, 34, 285—444, 1971.
- Schultz S. G., Curran P. F.*, Coupled Transport of Sodium and Organic Solutes, *Physiol. Rev.*, 50, 637—718, 1970.
- Scrutton M. C., Utter M. F.*, Regulation of Glycolysis and Gluconeogenesis in Animal Tissues, *Annu. Rev. Biochem.*, 37, 249—302, 1968.
- Scrutton M. C., Young M. R.*, Pyruvate Carboxylase, pp. 1—35, in: P. D. Boyer, ed., *The Enzymes*, 3d ed., vol. VI, Academic Press, Inc., New York, 1972.
- Seubert W., Schoner W.*, The Regulation of Pyruvate Kinase, *Curr. Top. Cell. Regul.*, 3, 237—267, 1971.
- Srere P. A.*, The Citrate-Enzymes: Their Structure, Mechanisms and Biological Functions, *Curr. Top. Cell. Regul.*, 5, 229—283, 1972.
- Strominger J. L., Izaki K., Matsushita M., Tipper D. J.*, Peptidoglycan Transpeptidase and D-Alanine Carboxypeptidase: Penicillin-sensitive Reactions, *Fed. Proc.*, 26, 9—22, 1967.
- Turner J. F., Turner D. H.*, Regulation of Carbohydrate Metabolism, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 26, 159—186, 1955.
- Utter M. F., Barden R. E., Taylor B. L.*, Pyruvate Carboxylase: An Evaluation of the Relationships between Structure and Mechanisms and between Structure and Catalytic Activity, *Adv. Enzymol.*, 42, 1—72, 1975.
- Utter M. F., Kolenbrander H. M.*, Formation of Oxaloacetate by CO₂ Fixation on Phosphoenolpyruvate, pp. 117—168, in: P. D. Boyer, ed., *The Enzymes*, 3d ed., vol. VI, Academic Press, Inc., New York, 1972.
- Waechter C. J., Lennarz W. J.*, The Role of Polyprenol-linked Sugars in Glycoprotein Biosynthesis, *Annu. Rev. Biochem.*, 45, 95—112, 1976.
- Williams J. F., Rientis K. G., Schofield P. J., Clark M. G.*, The Pentose Phosphate Pathway in Rabbit Liver, *Biochem. J.*, 123, 923—943, 1971.

Глава 16

МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ. III

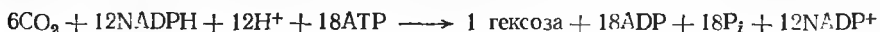
Фотосинтез

Первичным источником энергии в биосфере является поглощаемый хлорофиллсодержащими клетками свет, который используется для фиксации CO_2 с образованием углеводов.



Этот процесс восстановления CO_2 за счет H_2O , термодинамически невероятный в иных условиях, фактически представляет собой обращение процесса окисления глюкозы. Теоретически для этого процесса требуется минимальная свободная энергия, равная той, которая освобождается при окислении глюкозы, т. е. 686 000 кал/моль. Когда суспензию водорослей освещают в отсутствие CO_2 , затем помещают в темноту и вносят $^{14}\text{CO}_2$, фиксация $^{14}\text{CO}_2$ в углеводы осуществляется в течение короткого, но все же достаточно продолжительного времени. Таким образом, процесс фиксации CO_2 сам по себе не является, строго говоря, светозависимым. Ознакомление в первую очередь с химическими процессами, в ходе которых совершается фиксация CO_2 и перевод углерода в углеводы, облегчит понимание механизмов, благодаря которым электромагнитная энергия превращается в химическую, используемую в указанном эндергоническом процессе.

Химическая энергия, непосредственно используемая для превращения CO_2 в углеводы, заключена в смеси АТФ и восстановительного эквивалента в форме NADPH:



Таким образом, энергия 18 АТФ используется для того, чтобы направлять в сторону синтеза глюкозы (влево) превращение в системе



равновесие которой при иных условиях благоприятствует сдвигу реакции вправо. В растительной клетке первичный фотосинтетиче-

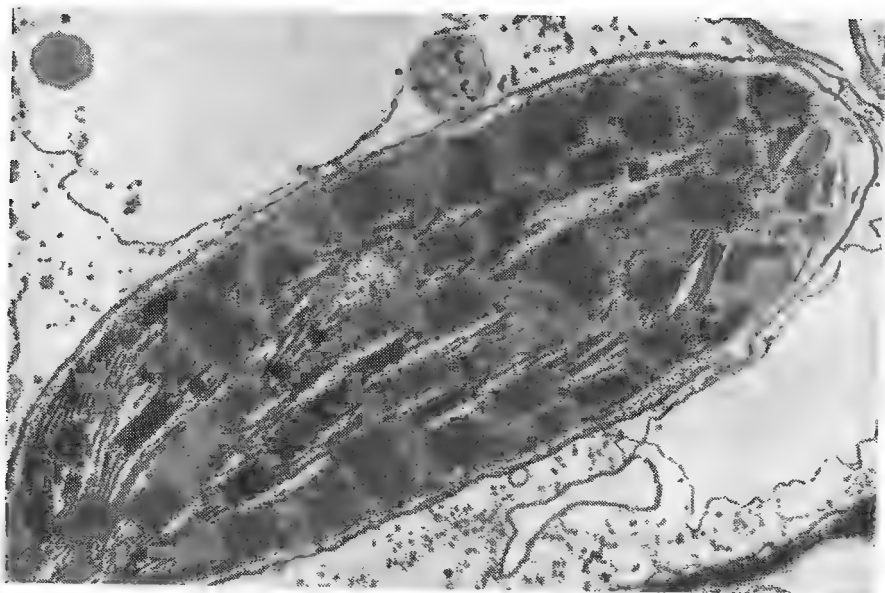
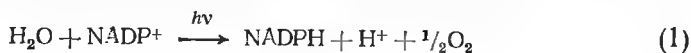


Рис. 16.1. Электронная микрофотография хлоропласта из клетки мезофилла *Zea mays*. $\times 16\,500$. (Любезно предоставлена д-ром L. K. Shumway.) Подробности см. на рис. 16.8.

ский аппарат утилизирует энергию абсорбированных квантов света, чтобы производить синтез как NADPH, так и ATP.



У высших растений эти процессы совершаются в *хлоропластах* (рис. 16.1) — сложно организованных клеточных тельцах (длина 3—10 мкм и диаметр 0,5—2,0 мкм), число которых в типичной клетке составляет от 50 до 200. Внутри хлоропласта имеются от 10 до 100 более или менее близких к цилиндрическим по форме структур — *гран*, каждая из которых представляет собой стопку уплощенных дисков — *тилакоидов*. Оболочка хлоропласта включает две мембраны. Наружная мембрана хлоропласта, подобно наружной мембране митохондрии, содержит большое количество липидов; по своей структуре она напоминает мембраны эндоплазматической сети и обладает слабыми барьерными свойствами для прохождения ионов или молекул с молекулярной массой до 10 000. По другую сторону межмембранного пространства находится истинная мембрана хлоропласта, относительно непроницаемая не

только для больших молекул, но и для протонов, гидроксидных ионов, большинства заряженных молекул и даже таких малых нейтральных молекул, как сорбит.

Большая часть физиологически значимого транспорта через хлоропластовую мембрану осуществляется при участии трех *транслоказ*. По своим свойствам они подобны транслоказам митохондрий (разд. 12.3.1). *Фосфаттранслоказа* облегчает вход P_i в пространство стромы в обмен на выход либо диоксиацетонфосфата, либо 3-фосфоглицерата, которые, кроме того, могут также в любом направлении обмениваться друг на друга. При участии *дикарбоксилаттранслоказы* такие дикарбоксилаты, как оксалоацетат, малат, сукцинат, фумарат, аспартат и глутамат, могут обмениваться через мембрану хлоропласта с любым другим членом этого ряда. *Адениннуклеотидтранслоказа* работает только в одном направлении, облегчая вход АТФ в обмен на выход АДФ, но не наоборот. Создается впечатление, что именно CO_2 , а не H_2CO_3 или HCO_3^- проникает сквозь эту мембрану. Количество HCO_3^- в цитозоле в ~ 20 раз выше количества H_2CO_3 ; полагают, что находящаяся в избытке карбоангидраза (гл. 8) обеспечивает соответствующий темп дегидратации HCO_3^- и H_2CO_3 до CO_2 , так что последний может диффундировать со скоростью, достаточной для поддержания фотосинтеза.

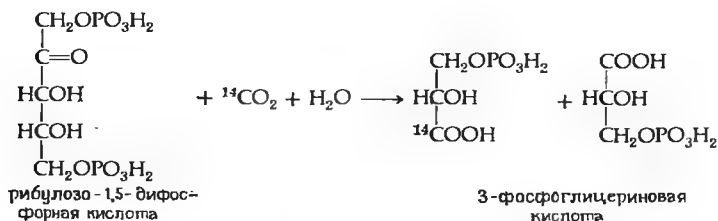
Внутри самого хлоропласта энергия абсорбированных квантов света утилизируется сложным ансамблем белков в организованной структуре тилакоидной мембраны для обеспечения синтеза АТФ и восстановления NADP^+ ; конечная стадия каждого из этих процессов разворачивается на тилакоидной мембране со стороны стромы. Таким образом, несмотря на то что тилакоидная мембрана возникает путем почкования внутренней мембраны хлоропласта, эти две мембраны обладают различными свойствами. Все ферменты, требующиеся для утилизации АТФ и NADPH в процессе фиксации CO_2 , либо растворены в жидкости стромы, либо закреплены на той стороне тилакоидной мембраны, которая обращена к строме. Конечным продуктом этого процесса является диоксиацетонфосфат, который покидает хлоропласт при участии транслоказы в обмен на P_i или 3-фосфоглицерат и превращается в цитозоле в гексозу, а затем в сахарозу или крахмал.

16.1. Фиксация CO_2

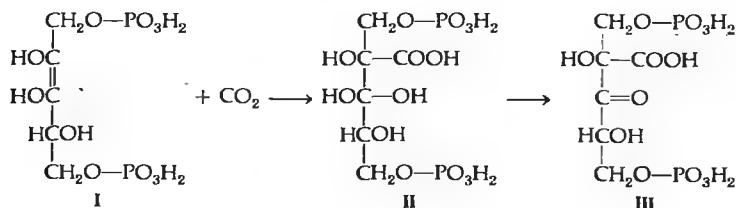
16.1.1. Темновая реакция

Первым соединением, в котором обнаруживается радиоактивность после введения на короткое время $^{14}\text{CO}_2$ в суспензию фотосинтезирующих водорослей, является 3-фосфоглицериновая кисло-

та, меченная преимущественно по карбоксильному углероду. Реакция образования этого соединения катализируется *рибулозо-1,5-дифосфат-карбоксилазой*.



Допускают существование связанных с ферментом нескольких промежуточных продуктов:



Синтетическая кетокислота III расщепляется ферментом на две молекулы 3-фосфоглицерата со скоростью, превышающей $V_{\max}$ из суммарной реакции с субстратами.

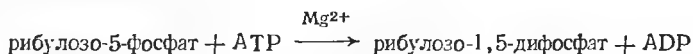
Фермент из шпината состоит из восьми α -субъединиц (с массой по 55 000) и восьми β -субъединиц (с мол. массой по $\sim 12\,000$ — $13\,000$). Частицы фермента обнаруживаются при электронной микроскопии в виде кубических структур, выступающих в строуму с поверхности тилакоидной мембраны. Карбоксилазы из всех растительных источников, в том числе из водорослей, довольно близки; число субъединиц на одну молекулу возрастает в ходе эволюции. Так, молекулярные массы ферментов из *Rhodospirillum rubrum*, *Chlorobium*, сине-зеленых водорослей и листьев шпината равны соответственно 114 000, 350 000, 450 000 и 550 000. Октамер α_8 из всех источников катализирует реакцию карбоксилирования; β -единицы выполняют регуляторную функцию. В присутствии Mg^{2+} и при высоких концентрациях фермента оптимум pH интактного фермента сдвигается от довольно щелочных уровней, при которых форма α_8 наиболее активна, до pH $\sim 7,8$; $K_m^{\text{CO}_2}$ составляет 12—20 мкмоль/л. В связи с этим интересно, что α_8 , лишенная β -единиц, найдена у фотосинтезирующих бактерий, подобных *Rhodospirillum*

rubrum, и что у растений ген, кодирующий α -единицы, содержится в хлоропластной ДНК, в то время как ген для β -единиц — в ядерной ДНК (гл. 25). Этот фермент составляет до 25% всего белка листьев и поэтому является самым распространенным ферментом в природе.

16.2. Синтез углеводов

При насыщающих уровнях освещенности листья пшеницы могут фиксировать CO_2 с максимальными скоростями, если поддерживается $[\text{CO}_2]$ от 4 до 10 мкмоль/л; $K_m^{\text{CO}_2}$ для свежих препаратов рибулозо-дифосфат-карбоксилазы пшеницы при оптимальном для фермента pH, $[\text{Mg}^{2+}]$ и т. д. приблизительно в два раза превышает эти значения. Принимая во внимание высокую концентрацию фермента в листьях, можно считать его активность достаточной для обеспечения наблюдаемых скоростей фиксации CO_2 у большинства растений.

Рибулозо-1,5-дифосфат образуется в реакции, катализируемой *фосфорибулокиназой*:



Синтез гексозы из 3-фосфоглицерата в принципе мог бы завершаться ферментами гликолиза. Однако, если бы все молекулы 3-фосфоглицерата превращались в гексозу путем обращения гликолиза, не оказалось бы в наличии рибулозодифосфата, необходимого в качестве акцептора CO_2 в последующих реакциях фиксации. Эту ситуацию следует рассматривать как обратную той, которая складывается при прохождении фосфоглюконатного пути (гл. 14), а именно как создание регенерирующей системы, с помощью которой гексоза может накапливаться и рибулозо-1,5-дифосфат сохраняться для следующей реакции карбоксилирования. Это достигается согласованным действием ферментов гликолиза и ферментов фосфоглюконатного пути. Указанные реакции (путь Бенсона — Кальвина) приведены в табл. 16.1, где описано образование одной молекулы диоксиацетонфосфата при фиксации трех молекул CO_2 .

На стадиях 2 и 3 шесть молекул фосфоглицерата восстанавливаются до глицеральдегид-3-фосфата. Три молекулы глицеральдегид-3-фосфата превращаются в диоксиацетонфосфат на стадии 4. Одна из образовавшихся молекул диоксиацетонфосфата дальнейшим превращением не подвергается и представляет собой чистый результат процесса. На стадиях 5—11, те три молекулы глицеральдегид-3-фосфата, которые остались от стадии 3, и две имеющиеся молекулы диоксиацетонфосфата превращаются в три мо-

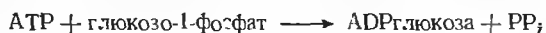
Таблица 16.1
Образование триоз и регенерация пентоз в фотосинтезе

Ста- дия	Фермент	Реакция
1	Рибулозодифосфаткарбоксылаза	3 рибулозо-1,5-дифосфат + $3\text{CO}_2 \longrightarrow$ 6 3-фосфоглицерат
2	Фосфоглицраткиназа	6 3-фосфоглицерат + АТФ $\longrightarrow$ 6 1,3-дифосфоглицерат
3	Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа	6 1,3-дифосфоглицерат + $6\text{NADPH} + 6\text{H}^+ \longrightarrow$ 6 глицеральдегид-3-фосфат + $6\text{NADP}^+ + 6\text{P}_i$
4	Триозофосфатизомераза	3 глицеральдегид-3-фосфат $\longrightarrow$ 3 диоксиацетонфосфат
5	Альдолаза	глицеральдегид-3-фосфат + диоксиацетонфосфат $\longrightarrow$ фруктозо-1,6-дифосфат
6	Фруктозодифосфатаза	фруктозо-1,6-дифосфат $\longrightarrow$ фруктозо-6-фосфат + P_i
7	Транскетолаза	фруктозо-6-фосфат + глицеральдегид-3-фосфат $\longrightarrow$ эритрозо-4-фосфат + ксилулозо-5-фосфат
8	Альдолаза	эритрозо-4-фосфат + диоксиацетонфосфат $\longrightarrow$ седогептулозо-1,7-дифосфат
9	Гептулозодифосфатаза	седогептулозо-1,7-дифосфат $\longrightarrow$ седогептулозо-7-фосфат + P_i
10	Транскетолаза	седогептулозо-7-фосфат + глицеральдегид-3-фосфат $\longrightarrow$ рибозо-5-фосфат + ксилулозо-5-фосфат
11	Фосфопентозэпимераза	2 ксилулозо-5-фосфат + рибозо-5-фосфат $\longrightarrow$ 3 рибулозо-5-фосфат
12	Фосфорibuлокиназа	3 рибулозо-5-фосфат + $3\text{ATP} \longrightarrow$ 3 рибулозо-1,5-дифосфат + 3ADP
		$3\text{CO}_2 + 9\text{ATP} + 6\text{NADPH} + 6\text{H}^+ \longrightarrow$ диоксиацетонфосфат + $9\text{ADP} + 6\text{NADP}^+ + 8\text{P}_i$

лекулы рибулозо-5-фосфата под действием ферментов, подобных участвующим в фосфоглюконатном пути. Последовательность завершается фосфорилированием за счет АТР (стадия 12), и возникающий в результате рибулозо-1,5-дифосфат используется при повторении цикла.

В конце табл. 16.1 приведено суммарное уравнение цикла, с помощью которого можно определить количество энергии, необходимое для того, чтобы стала возможной фиксация CO_2 и перевод его в углеводы. Синтез 2 молей диоксиацетонфосфата, требуемых для образования гексозы, нуждается в том, чтобы фотохимическая система выработала 12 молей NADPH и 18 молей АТР; фиксация 1 моля CO_2 сопряжена с затратой 2 молей NADPH и 3 молей АТР. Достоверность этой схемы реакций подтверждена изучением модельного процесса с использованием очищенных ферментов.

После того как диоксиацетонфосфат проник в цитозоль при участии P_1 -транслоказы, он превращается в пригодные для использования углеводы под действием ферментов гликолиза. Из половины его молекул вновь образуется глицеральдегид-3-фосфат под действием изомеразы; затем синтезируется фруктозо-1,6-дифосфат, который гидролизуются до фруктозо-6-фосфата, превращаемого в глюкозо-6-фосфат, а затем в глюкозо-1-фосфат. Последний может превращаться либо в крахмал через ADPглюкозу, либо в сахарозу через UDPглюкозу. Образование каждого из указанных двух соединений нуждается в затрате АТР; например,



Эти взаимоотношения обобщены на рис. 16.2.

Таким образом, в цитозоле имеется потребность в дополнительном количестве АТР. Однако АТР, генерируемая фотосинтетически в тилакоидной системе (см. ниже), не может покидать хлоропласт, и поэтому, если скорость образования АТР в процессе аэробного гликолиза и митохондриального дыхания недостаточна, включается специальное приспособление для экспорта эквивалента АТР из стромы (рис. 16.3). Благодаря такому устройству NADH, равно как и АТР, образуемые в хлоропласте, могут участвовать в реакциях синтеза сахарозы или крахмала в цитозоле. Если восстановительные эквиваленты имеются в избытке, они могут быть возвращены в строму либо через малат-оксалоацетатный цикл, либо через малат-аспартатный цикл, аналогичные тем, которые пересекают мембрану митохондрий (рис. 12.16).

Синтез углеводов у бактерий. У некоторых фотосинтезирующих бактерий первым обнаруживаемым ^{14}C -меченным соединением является аланин, что указывает на образование пирувата из CO_2 и какого-то C_2 -соединения (возможно, ацетил-CoA) как на первичный этап процесса, за которым следует реакция переамин-

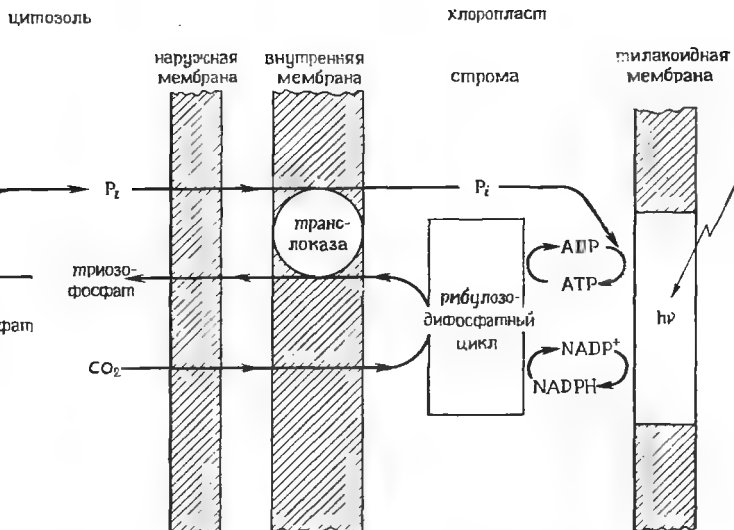


Рис. 16.2. Общая схема фотосинтеза сахарозы из CO_2 . Восстановление NADP^+ и синтез АТФ происходят в тилакоидной мембране, а фиксация CO_2 и синтез диоксиацетонфосфата — в строме; гексоза, сахароза и крахмал синтезируются в цитозоле. (Взято с изменениями из работы [Heldt H. W., Horiz. Biochem. Biophys., 2, 218, 1976].)

нирования (разд. 20.3.2). Сопутствующее появление метки в глутаминовой кислоте позволяет предположить подобный способ образования α -кетоглутаровой кислоты из CO_2 и сукцинил-СоА. Гипотетическая схема пути, при котором CO_2 , фиксированная благодаря действию указанных механизмов, может аккумулироваться в форме гексозы, представлена на рис. 16.4. У фотосинтезирующих бактерий стадия образования глицеральдегид-3-фосфата связана с NAD , а не с NADP , как у водорослей и хлоропластов.

Роль C_4 -дикарбоновых кислот у некоторых растений. Тропические злаки и различные другие покрытосеменные растения выдерживают экстремальные климатические условия, эффективно фиксируя CO_2 при его низких концентрациях в окружающей среде; им свойственны малые скорости фотодыхания (см. ниже). Характерно, что, когда листья растений экспонируются с $^{14}\text{CO}_2$, первыми мечеными продуктами являются оксалоацетат, малат и аспарат. В листьях таких растений вблизи поверхности соприкосновения с воздухом находятся клетки мезофилла, в которых происходит связывание CO_2 в форме C_4 -соединений. В клетках мезофилла хлоропласты иногда расположены более редко, а грани характеризуются рыхлой упаковкой. Клетки мезофилла примыкают

к клеткам обкладки сосудистого пучка; эти клетки богаты хлоропластами, причем грани их плотно упакованы. Благодаря такому устройству становится возможным функционирование транспортной системы (рис. 16.5), которая поддерживает $[CO_2]$ в клетках обкладки на уровнях ≥ 10 мкмоль/л (т. е. в два раза больше возможной) при условии, что воздух находится в равновесии с клеточной жидкостью при pH 7,5 и 20 °C. Следует учесть, что по мере удаления клеток обкладки от поверхности и с увеличением числа барьеров, препятствующих диффузии, концентрация CO_2 в таких клетках при иных условиях не могла бы превышать 1 мкмоль/л, т. е. была бы примерно на порядок меньше необходимой для поддержания рибулозодифосфат-карбоксилазной реакции. C_4 -фиксирующая система клеток мезофилла служит фактически в качестве насоса, который поддерживает $[CO_2]$ в клетках обкладки даже более высокой, 10 мкмоль/л, так что лимитирующим фактором скорости фотосинтеза является интенсивность света, а не $[CO_2]$. К числу оснащенных таким аппаратом растений относятся некоторые из самых молодых представителей покрытосеменных растений, таких, например, как сахарный тростник, кукуруза, сорго и большинство более выносливых дикорастущих растений.

Состав компонентов в фиксирующей CO_2 системе у C_4 -растений может подвергаться некоторым изменениям. В наиболее часто встречающемся варианте аспарагиновая кислота заменяет аланин (рис. 16.6). У одних видов растений аспартат превращается

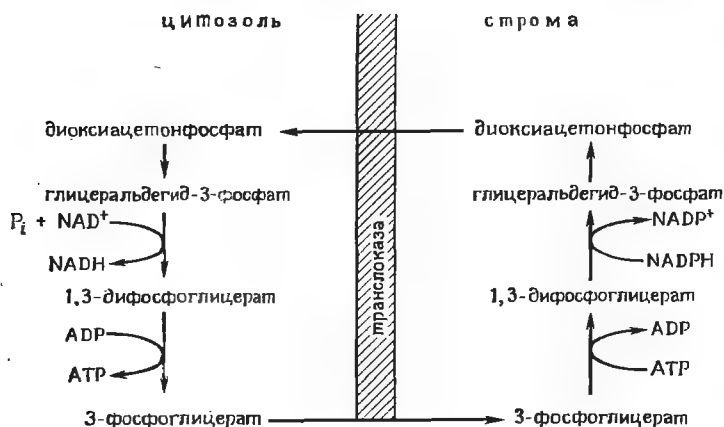


Рис. 16.3. Диоксиацетонфосфатный челнок. В результате окисления глицеральдегид-3-фосфата в цитозоле генерируются NADH и АТР, доступные для использования в различных синтезах. 3-Фосфоглицерат возвращается в строма, где при утилизации фотосинтетически генерированных АТР и NADPH он вновь превращается в диоксиацетонфосфат и весь процесс повторяется.

III. МЕТАБОЛИЗМ

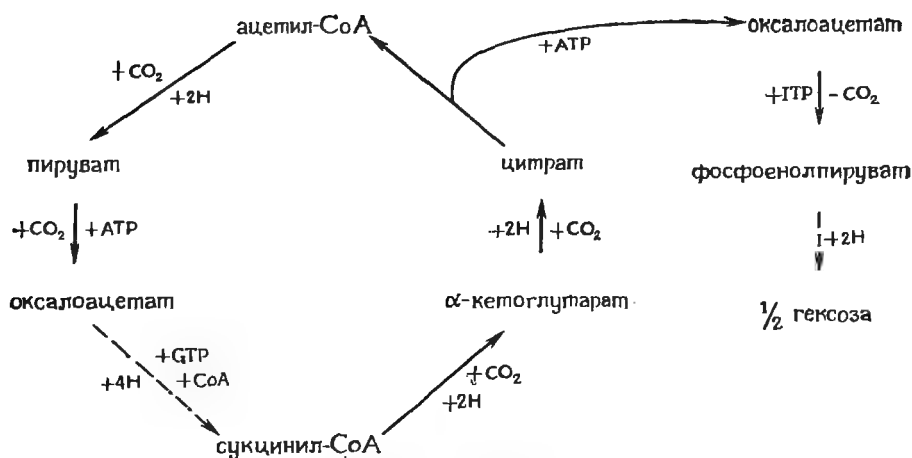


Рис. 16.4. Ориентировочная схема пути аккумуляции гексозы у некоторых фотосинтезирующих бактерий.

в оксалоацетат в цитозоле, у других — в митохондриях. Это самая простая система, но она нуждается в поступлении восстановительных эквивалентов в той же мере, как и в обеспечении CO_2 .

Фотодыхание. Одна из совершенно удивительных особенностей метаболизма растений заключается в выраженной интенсификации «дыхания» (поглощения O_2), которое отмечается почти у всех растений при освещении. Этот, очевидно, бесполезный эффект свя-

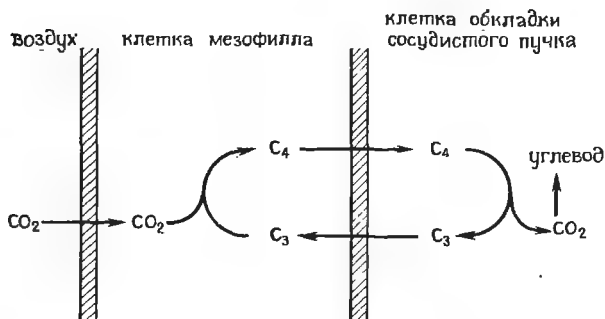


Рис. 16.5. Общая схема метаболизма у C_4 -растений. В клетках мезофилла CO_2 фиксируется в C_4 -соединение, которое транспортируется в клетки обкладки сосудистого пучка, где в результате декарбоксилирования поддерживается $[\text{CO}_2]$, необходимая для эффективного оперирования рибулозидифосфаткарбоксилазы.

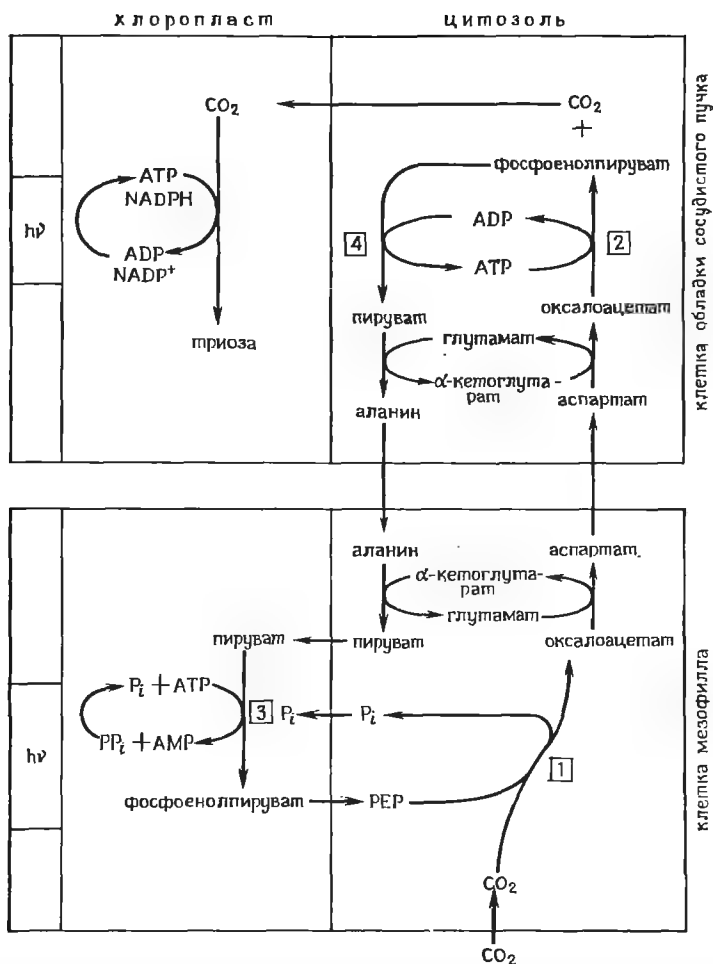
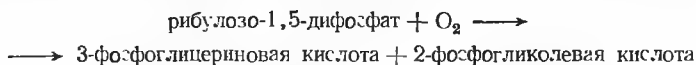


Рис. 16.6. Одно из устройств для транспорта метаболитов в C_4 -растениях. Источником энергии служит АТФ, синтезируемый в хлоропласте клетки мезофилла и используемый для образования фосфоенолпирувата в пируватотрoфосфатдикиназной реакции (реакция 3) (разд. 14.5.1.). В цитозоле такой клетки CO_2 фиксируется в фосфоенолпируваткарбоксилазной реакции (реакция 1) с образованием оксалоацетата, который затем переаминируется в аспарат; последний передвигается в цитозоль клетки оболочки сосудистого пучка. Аминогруппа элиминируется путем переаминирования, и вновь образовавшийся оксалоацетат декарбоксилируется под действием фосфоенолпируваткарбоксикиназы до CO_2 и фосфоенолпирувата (реакция 2). После этого CO_2 становится доступной фотосинтетической системе стромы хлоропласта для синтеза углеводов. Прежде чем вернуться в клетку мезофилла, фосфоенолпируват отдает свой фосфат молекуле ADP , что катализируется пируваткиназой (реакция 4), и возникший в результате пируват принимает от α -кетоглутарата аминокетогруппу, ранее полученную им от аспартата. Аланин возвращается в клетку мезофилла, где он опять превращается в пируват, наличие которого необходимо для повторения цикла. Каждый из малых циклов не нуждается в затрате энергии: два эквивалента АТФ, утилизируемые в реакции 3, достаточны для осуществления процесса в целом.

зан с тем фактом, что рибулозодифосфат-карбоксилаза является одновременно оксигеназой и может катализировать реакцию

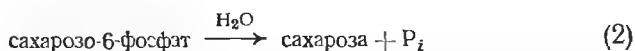


V_{max} для карбоксилирования почти в 4 раза выше, чем для оксигеназной реакции, если оба процесса измерены при идеальных условиях. Вызываемое светом увеличение $[\text{NADH}]$ и снижение [рибулозо-1,5-дифосфат] активируют оксигеназную реакцию в той же самой степени, как реакцию карбоксилирования. При 25°C и $\text{pH } 8,4$ $K_m^{\text{CO}_2} = 12$ мкмоль/л и $K_m^{\text{O}_2} \approx 300$ мкмоль/л. Отсюда следует, что на воздухе реакция карбоксилирования происходит лишь в 2,5 раза быстрее, чем оксигеназная.

Образуемый таким путем фосфогликолат не превращается в углеводы, он гидролизуется до $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ (гликолат) и окисляется ферментом пероксисом до $\text{O}=\text{CH}-\text{COOH}$ (глиоксилат); последний частично трансаминируется в глицин и вступает в систему путей аминокислотного метаболизма. Большая часть глиоксилата, однако, окисляется в реакциях, которые не способствуют ни генерации АТФ, ни накоплению углеводов. Никакая полезная функция, насколько известно, с этими реакциями не связана. Хотя фотодыхание и не доставляло затруднений самым древним фотосинтезирующим клеткам, поскольку в атмосфере было мало O_2 , сохранение в настоящее время этого неэффективного свойства фермента должно казаться удивительным. Узкие пределы, которые определяют эффективность действия рибулозодифосфат-карбоксилазы, отчетливо выражены у мутанта *Chlamydomonas reinhardtii*, карбоксилаза которого обладает по отношению к ферменту клеток дикого типа в два раза более высокой оксигеназной активностью, но в три раза меньшей карбоксилазной активностью. Этот штамм неспособен к росту за счет фотосинтетической аккумуляции углеводов, и необходимо вносить глюкозу в среду выращивания.

Фотодыхание приводит к большим потерям во всемирном выходе фотосинтеза сельскохозяйственных культур и деревьев. Большим преимуществом C_4 -растений, описанных ранее, является то, что их карбоксилаза действует в среде, где $[\text{CO}_2]$ в 3—10 раз выше обычной, в то время как $[\text{O}_2]$ несколько уменьшена, так что карбоксилирование преобладает над оксигеназной реакцией. Это особенно важно для тропических злаков, которые должны справляться с высокими температурами окружающей среды. Энергия активации E_a для карбоксилирования составляет лишь $2/3 E_a$ для оксигенирования; отсюда следует, что с увеличением температуры оксигенирующая активность будет возрастать сильнее, чем карбоксилирующая.

Образование сахарозы. По мере накопления гексозы в цитозоле глюкозо-1-фосфат при участии соответствующей пирогосфориллазы используется для образования UDPглюкозы, которая затем в ходе двух последовательных реакций превращается в сахарозу:

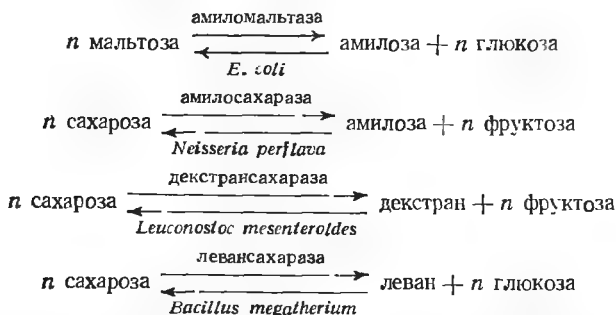


ΔG° для гидролиза 1 $\rightarrow$ 2-связи между аномерными углеродами сахарозы необычно велика для гликозида, а именно составляет -6600 кал/моль. Поскольку для гидролиза UDPглюкозы $\Delta G^\circ \approx -7500$ кал/моль, реакция (1) может протекать в указанном направлении, но только гидролитическое отщепление 6-фосфата в реакции (2) гарантирует синтез сахарозы. *Сахарозо-6-фосфатсинтетаза* характеризуется сигмондной кинетикой по обоим субстратам, что свидетельствует об аллостерической регуляции этого фермента.

Относительно мало сахарозы удерживается в фотосинтезирующих клетках высших растений. Большая часть сахарозы диффундирует из клеток в транспортные системы и поступает в нефосфорилирующие ткани — процесс, наиболее ярко выраженный у сахарного тростника и сахарной свеклы.

16.2.1. Синтез гомополисахаридов

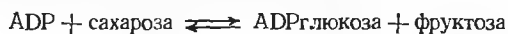
В процессе образования гомополисахаридов в качестве исходного материала может использоваться сахароза. Различные нефотосинтезирующие бактерии для этой цели развили механизмы трансгликозилирования. Некоторые бактериальные трансгликозиллазы перечислены ниже.



Декстран представляет собой линейный полимер, в котором первый углеродный атом каждой глюкозной единицы соединен гликозидной связью с гидроксилом при шестом атоме углерода со-

седнего остатка; таким образом, повторяющаяся единица — изомальтоза. Аналогично построен леван, фруктозные остатки которого соединены 2,6-фруктозидной связью. Механизм синтеза этих соединений сходен с механизмом синтеза гликогена, в котором принимает участие гликоген-ветвящий фермент (гл. 15). Внеклеточным отложением этих полимеров, которое вызывает появление пятен на дентине, может объясняться выраженная корреляция между количествами принимаемой сахарозы и кариесом зубов.

У растений (в том числе и у водорослей) синтез крахмала начинается с нуклеозиддифосфатглюкозы. Образование UDPглюкозы и ADPглюкозы из сахарозы совершается путем обращения действия сахарозосинтетазы, для которой $K_{eq} = 0,15$.

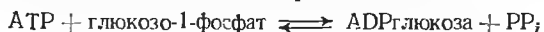


UDPглюкоза расходуется для образования целлюлозы и для различных превращений, уже рассмотренных в гл. 15. ADPглюкоза — субстрат для синтеза крахмала, который во всех прочих отношениях протекает аналогично синтезу гликогена из UDPглюкозы у животных. Неясно, какое количество сахарозы превращается при помощи указанного механизма в ADPглюкозу. Дело в том, что в некоторых синтезирующих крахмал клетках содержится также фермент сахараза, который катализирует простой гидролиз сахарозы до составляющих ее моносахаридов, благодаря чему оба становятся доступными для тех путей метаболизма, которые ведут к синтезу глюкозо-1-фосфата; другие клетки могут содержать *сахарозофосфорилазу*, которая катализирует реакцию



В фотосинтезирующих клетках синтез крахмала начинается от глюкозо-1-фосфата, и процесс не включает сахарозу в качестве промежуточного продукта.

Регуляция в растениях и бактериях. Поскольку у животных в дополнение к синтезу гликогена существует множество альтернативных путей превращения UDPглюкозы, представляется наиболее вероятным, что контроль синтеза гликогена у животных реализуется на стадии пусковой реакции, а именно на уровне гликогенсинтазы и гликоген-фосфорилазы. Однако непосредственным предшественником в синтезе запасных полисахаридов, таких, как растительный крахмал и гликогенподобные полимеры различных бактерий, является не UDPглюкоза, а ADPглюкоза. В связи с тем что в таких клетках неизвестны иные реакции, в которых участвует ADPглюкоза, пусковой стадией, ведущей к формированию полимера, очевидно, должна быть реакция



Контроль синтеза полимера путем регуляции активности пирогосфорилазы, которая катализирует приведенную реакцию, очевидно, является биологически выгодным приспособлением. У различных организмов контроль осуществляется неодинаковыми способами (табл. 16.2).

Таблица 16.2

**Активаторы и ингибиторы АДФглюкозопирогосфорилаз
из различных источников**

Источник	Первичный активатор	Вторичный активатор	Ингибитор
Листья высших растений, зеленые водоросли	3-Фосфоглицерат	Фруктозо-6-Р, фруктозо-ди-Р, фосфоенолпироват	P_i
<i>E. coli</i> , <i>Aerobacter aerogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>P. aureus</i>	Фруктозо-ди-Р, NADPH, пиридоксаль-Р	2-Фосфоглицерат, глицеральдегид-3-фосфат, фосфоенолпироват	AMP
<i>Arthrobacter viscosus</i>		Пироват	P_i , AMP, ADP
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Фруктозо-6-Р	Рибозо-5-Р	P_i , AMP, ADP
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i>		Дезоксирибозо-5-Р	
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Пироват		
<i>Serratia marcescens</i>			AMP

Свойственный растениям контрольный механизм действия пирогосфорилазы, построенный по принципу положительной прямой связи, осуществляется при участии 3-фосфоглицерата — первого продукта фотосинтетической фиксации CO_2 . V_{max} при этом возрастает у различных видов до 10—100 раз; у ячменя такая малая концентрация 3-фосфоглицерата, как 0,007 ммоль/л, достаточна для максимальной активации пирогосфорилазы. Другие интермедиаты гликолиза, особенно фруктозо-6-фосфат, вызывают подобные, но более слабые эффекты. P_i , напротив, отрицательный эффектор, K_i которого варьирует от вида к виду в интервале 0,02—0,2 ммоль/л.

Пирогосфорилазы бактерий кишечной группы стимулируются фруктозодифосфатом и NADPH, каждый из которых, вероятно, может накапливаться в условиях, когда рост ограничен из-за дефицита любого компонента питания, за исключением самой глюкозы. У фотосинтезирующего организма *Rhodospirillum rubrum*, который неспособен усваивать экзогенную глюкозу, но может жить

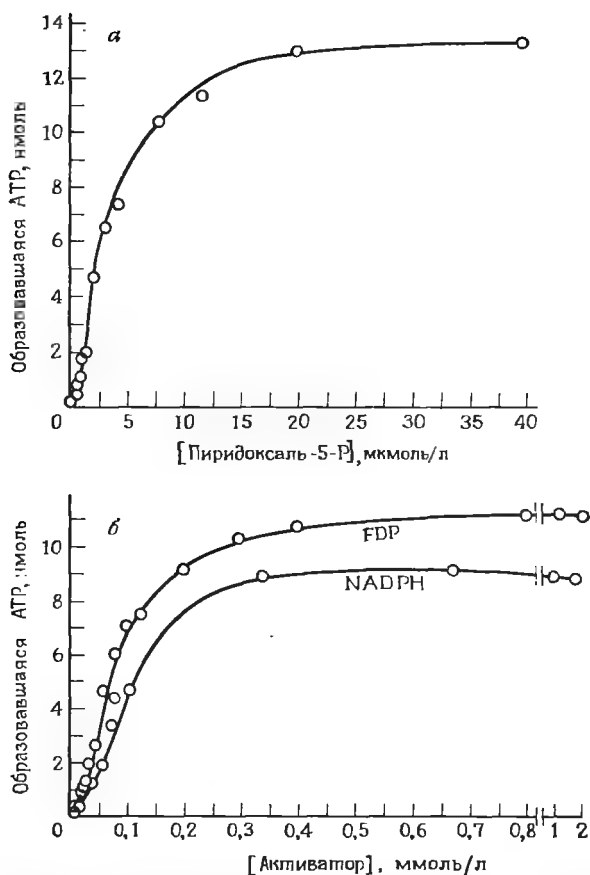


Рис. 16.7. Влияние концентраций активатора на скорость пирофосфорилиза АДФглюкозы. Активаторами являются фруктозо-1,6-дифосфат (FDP), NADPH и пиридоксаль-5-фосфат; фермент получен из *E. coli*. Концентрации АДФглюкозы и PP_i одинаковы в каждой пробе. [Preiss J., Curr. Topics Cell Regul., 1, 138 1969.]

в анаэробных условиях, используя интермедиаты цикла трикарбоновых кислот, имеется пирофосфорилаза, стимулируемая пируватом.

В ряде случаев у пирофосфорилаз наблюдаются сигмоидные кривые для зависимостей скорости реакций от [АТР]. В общем перечисленные в табл. 16.2 активаторы вызывают значительное снижение K_m как для АТР, так и для глюкозо-1-фосфата; иногда происходит увеличение V_{max} . Это иллюстрируется на примере удивительно сильной стимуляции пирофосфорилаз у *Enterobacteria* пиридоксальфосфатом (рис. 16.7). Как и в случае гликоген-фос-

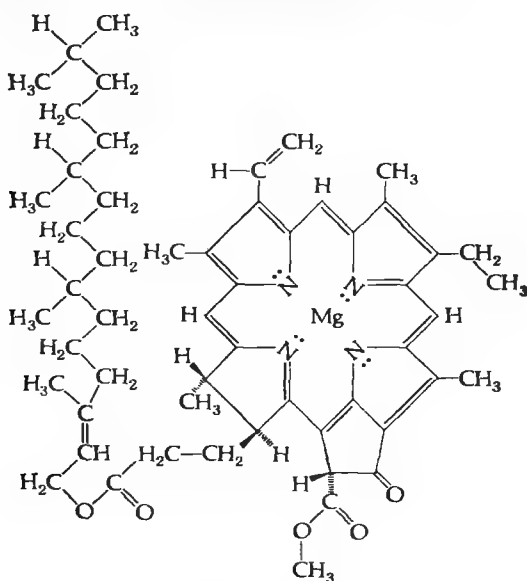
форилазы животных, этот кофактор выполняет только структурную роль. Преимущества, которые получает клетка от того, что P_i и АМР действуют как ингибиторы этих пирофосфорилаз, очевидны.

Контроль образования запасных полисахаридов, осуществляемый таким способом, позволяет избежать необходимости в сложном механизме контроля гликоген-синтазы, характерном для тканей млекопитающих. Более того, у растений нет необходимости в механизме для быстрого превращения гликогена в глюкозо-6-фосфат, подобного таковому в мышце или печени. В соответствии с этим жизнь растения не лимитирована отсутствием системы, которая была бы равноценна обратимой системе гликоген-фосфорилаза a — гликоген-фосфорилаза b ; аллостерическая регуляция пирофосфорилазы, по-видимому, вполне достаточна для растений и бактерий.

16.3. Фотосинтетический процесс

16.3.1. Молекулярная абсорбция света

Фундаментальная стадия фотосинтеза заключается в абсорбции световой энергии хлорофиллом. Хлорофилл a — это магний-порфирин, одно из пиррольных колец которого частично восстановлено и который содержит еще одно, пятое изоциклическое кольцо; он является главным хлорофиллом водорослей и высших растений. Обе кислотные боковые цепи этерифицированы, одна — остатком метанола, другая — остатком фитола:



хлорофилл a

Неионизованный атом Mg удерживается двумя ковалентными и двумя координационными связями. В результате обработки хлорофилла слабой кислотой легко удаляется атом магния и образуется *феофитин*. Омыление щелочью приводит к образованию *хлорофиллидов* — солей освободившихся карбоксильных групп. Гидролиз хлорофилла ферментом *хлорофиллазой* сопровождается отрывом фитольной группы.

Энергия фотона (1 квант электромагнитного излучения) выражается следующим уравнением:

$$E = \frac{hc}{\lambda},$$

где h — постоянная Планка ($6,6 \cdot 10^{-27}$ эрг/с), c — скорость света ($3 \cdot 10^{10}$ см/с) и λ — длина волны. Перейдя к электронвольтам и нанометрам, получим

$$E = \frac{123\,500}{\lambda} \text{ (электронвольт).}$$

Например, для красного света при 675 нм 1 квант (фотон) соответствует 1,84 эВ; 1 моль таких фотонов (1 эйнштейн) соответствует 42 400 кал.

Каждая данная молекула способна поглощать свет только определенной длины волны; это обычно проявляется в виде *спектра поглощения*. Поглощенная энергия становится частью энергии молекулы, и про такую молекулу принято говорить, что она *активировалась*. Энергия поглощаемого фотона должна соответствовать энергии, требующейся, чтобы возбудить электрон и перевести его на орбиталь, более удаленную от атомного ядра, чем в основном состоянии. Хлорофилл обладает непрерывной системой чередующихся одинарных и двойных связей. В структурах этого типа электроны в связях, образованных путем перекрывания углеродных p -орбиталей, например в шести связях бензольного кольца, должны быть отнесены к молекуле в целом, а не к индивидуальным межатомным связям; когда поглощается свет, то высокоэнергетическим становится именно электрон в π -электронной системе. После поглощения фотона молекула может существовать в переходном возбужденном *синглетном* состоянии (время полупревращения такого состояния ~ 1 нс). Молекула может возвращаться в основное состояние, теряя энергию в виде тепла или излучая ее (флуоресценция). В качестве альтернативы молекула может стать несколько более стабильной, но все еще возбужденной путем перехода в *триплетное* состояние (время полупревращения такого сос-

стояния ~ 10 пс), при котором не только электрон изменяет свое положение и находится на более высокой энергетической орбитали, но происходит и обращение спина. Это возбужденное состояние может деградировать при помощи сходных механизмов или путем передачи электрона в более обычный путь «химического» переноса электрона.

Активированные молекулы могут также передать свою избыточную энергию с высокой эффективностью соседним молекулам того же или иного химического вида. Это происходит двумя путями. Если одинаковые молекулы, соответствующим образом ориентированные друг к другу, находятся на расстоянии 1—2 нм, перенос осуществляется в форме *экситонов*; для каждого данного электронного перехода кулоновские взаимодействия между дипольными моментами переходных состояний соседних молекул вызывают серию дискретных экситонных уровней энергии. Если молекулы удалены друг от друга на 5—10 нм, обмен энергией между ними совершается путем *индуцированного резонансного переноса энергии* — процесса, эквивалентного тому, который может возникнуть, если бы возбужденная молекула затухала путем флуоресценции, а другая молекула абсорбировала бы флуоресцируемые кванты, несмотря на то что фактически не происходило бы ни излучения, ни абсорбции истинного света. В этом случае вибрация электронного диполя второй молекулы инициируется аналогично тому, как происходит инициация колебаний камертона, находящегося поблизости от другого, уже вибрирующего камертона; это возможная форма переноса энергии в том случае, если спектр флуоресценции возбужденной молекулы значительно перекрывает спектр поглощения второй молекулы и если флуоресценция занимает период времени 1—10 пс.

16.3.2. Тилакоидная мембрана

Использование солнечной энергии для осуществления синтеза АТФ и восстановления NADP^+ становится возможным благодаря особенностям структуры и функции *тилакоидной* мембраны, или *ламеллы*. Как показано на рис. 16.8, тилакоид представляет собой как бы маленький мешок, где водная фаза, окружена липидным мембранным бислоем специфического состава. Стопки таких тилакоидов образуют *граны*; их прилегание друг к другу критическим образом зависит от адекватной $[\text{Mg}^{2+}]$.

В тилакоидной мембране три основных класса липидов присутствуют в соотношении $\sim 10:20:1$; к таким липидам относятся следующие (порядок перечисления соответствует соотношению): 1) галактозилглицериды и дигалактозилглицериды; 2) смесь фосфоглицеридов, включающая фосфатидилхолин, фосфатидилэтанол-

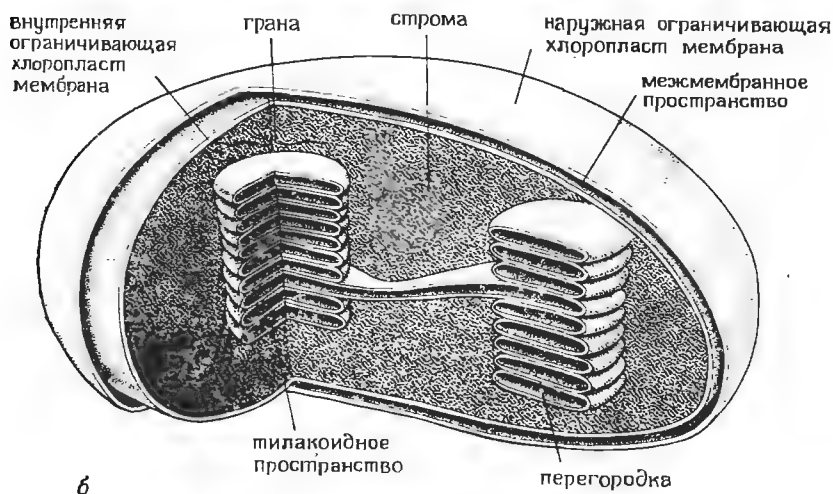
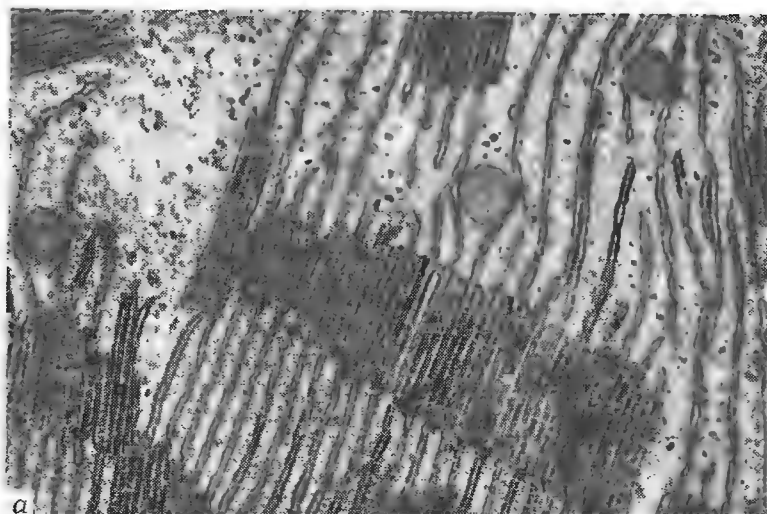
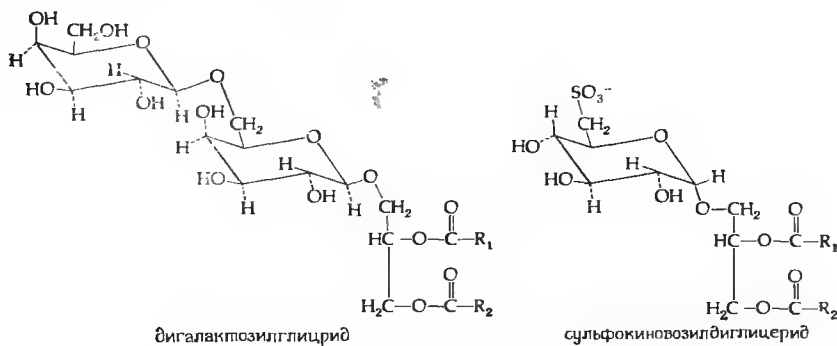


Рис. 16.8. а — электронная микрофотография одиночной граны хлоропласта из *Zea mays*, показанного на рис. 16.1 (любезно предоставлено д-ром L. K. Shumway); б — схема ультраструктуры хлоропласта. В среднем в хлоропласте имеется ~50 гран диаметром 0,3—0,6 мкм. Каждая грана — это стопка тилакоидов, которые представляют собой замкнутые мешки. Ламеллы стромы переходят в мембраны гран. Толщина тилакоидной мембраны ~6 нм; внутреннее пространство тилакоида, заключенное между двумя приблизительно параллельными стенками, занимает ~15 нм в поперечнике. (Взято с изменениями из работы [Wolfe S., Biology of the Cell, Wadsworth Publishing Co., Belmont, Calif., 1972].)

амин, фосфатидилинозит и фосфатидилглицерин; 3) сульфолипид, сульфоквиновозилдиглицерид



16.3.2.1. Хлорофилл-белковые комплексы

Большая часть хлорофилла (а вероятно, даже весь хлорофилл мембран водорослей и листьев) присутствует в форме ассоциатов по крайней мере с двумя специфическими белками. В комплексе I 14 молекул хлорофилла *a* связаны с белковым компонентом, имеющим мол. массу $\sim 110\,000$. В этот комплекс входит 10—20% всего хлорофилла мембран. Препараты комплекса I нередко содержат варьирующие количества других пигментов, которые, хотя физически и связаны с мембраной, не являются интегральными компонентами комплекса. Комплекс II включает белок с мол. массой $\sim 30\,000$; в этом комплексе по две или три молекулы как хлорофилла *a*, так и хлорофилла *b* связаны с одной молекулой белка. В комплекс II включено 60% всего хлорофилла растения. У хлорофилла *b* метильная группа кольца II хлорофилла *a* заменена формильным остатком $-\text{CHO}$, в результате чего основной пик поглощения сдвигается в коротковолновую область на 35 нм в сравнении с хлорофиллом *a*. Когда хлорофиллы *a* и *b* связаны со специфическими белками тилакоидной мембраны, их максимумы поглощения смещаются на ~ 20 нм в красную область, т. е. соответствуют максимумам в живой клетке. При обычном распределении комплексов I и II хлоропласты содержат в $\sim 2,5$ раза больше хлорофилла *a*, чем хлорофилла *b*.

Наиболее изученная в настоящее время хлорофилл-белковая структура получена из зеленой фотосинтезирующей бактерии *Chlorobium limicola*. Этот комплекс (мол. масса $\sim 150\,000$) состоит из трех идентичных белковых субъединиц, каждая из которых содержит семь молекул бактериохлорофилла. Принципиальное отличие последнего от хлорофилла *a* состоит в замене винильной группы $\text{CH}_2=\text{CH}-$ в кольце I порфиринового ядра на ацетиль-

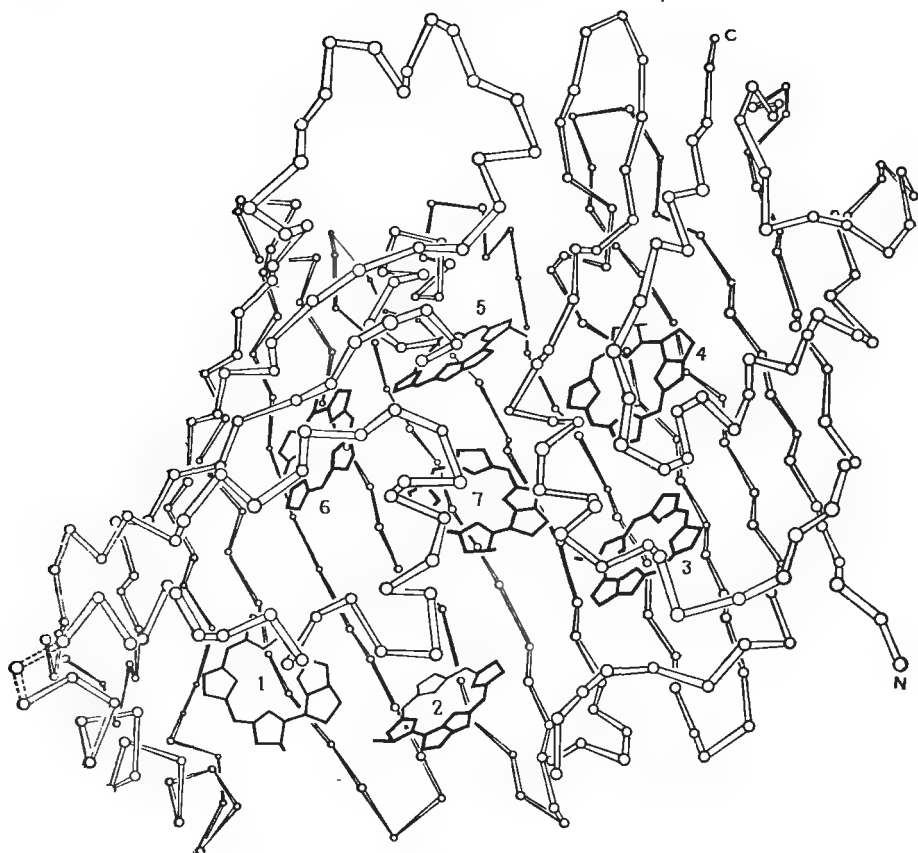


Рис. 16.9. Схема укладки полипептидного каркаса и хлорофильной сердцевины одной субъединицы бактериохлорофилл-белкового комплекса из *Chlorobium limicola*. Предполагаемые положения α -углеродов отмечены кружками. Непрерывность полипептидной цепи в некоторых местах не совсем достоверна. Чтобы не перегружать рисунок, не показаны ионы магния, заместители у хлорофильных колец и цепи фитола, за исключением первого хлорофилла. Объект рассматривается вдоль оси третьего порядка, которая параллельна к наружной поверхности молекулы. (Любезно предоставлено профессором В. М. Matthews.)

ную группу $\text{CH}_3\text{—CO—}$; кроме того, двойная связь между углеродными атомами 3 и 4 восстановлена, в результате чего максимум поглощения сдвинут почти на 100 нм в красную область. Все семь бактериохлорофилл-кольцевых систем заключены в полый цилиндр, сформированный примерно 15 антипараллельными нитями полипептидов, образующих β -структуру типа складчатого слоя (рис. 16.9). Истинная роль этого белка еще не установлена, но на

этом примере видно, каким образом хлорофилл может располагаться в белке. Семь молекул бактериохлорофилла, каждая из которых находится на расстоянии $\sim 1,2$ нм от двух других, могут беспрепятственно участвовать в экситонном переносе энергии.

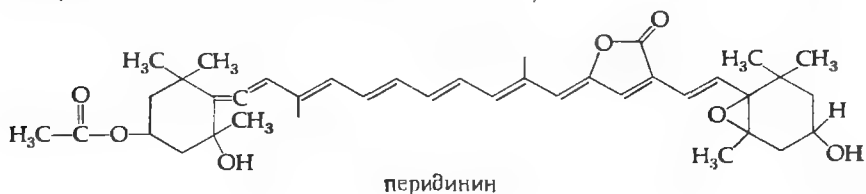
Хлорофилл-белковый комплекс из *Chlorobium* растворим в воде. Аналогичные комплексы из высших растений (крайне гидрофобные интегральные компоненты мембраны) могут быть извлечены только путем экстракции концентрированными растворами детергентов. Подобно многим другим мембраносвязанным белкам, они характеризуются высоким содержанием остатков гидрофобных аминокислот; фитольные цепи хлорофилла, длина которых составляет 2 нм, вероятно, располагаются на наружной поверхности комплекса и вписаны в структуру мембраны.

16.3.2.2. Дополнительные пигменты

Фотоактивация хлорофилла *a* представляет собой фотохимический акт фотосинтеза. Хлорофильные растворы кажутся зелеными потому, что хлорофилл *a* поглощает свет в областях 400—450 и 640—680 нм, но в области 450—640 нм практически прозрачен. При интенсивном освещении это обстоятельство не может иметь каких-либо физиологических последствий. Но при слабом освещении, когда метаболизм растения лимитируется скоростью подачи световой энергии, растение не было бы в состоянии использовать для своей пользы большую часть энергии падающего света, а именно в интервале 450—640 нм, если бы единственным функционирующим пигментом был хлорофилл *a*. Однако в действительности дело обстоит не так.

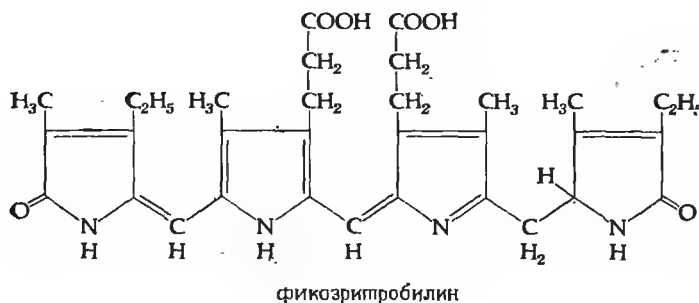
Неэффективность хлорофилла *a* как абсорбента света в особенности очевидна у погруженных водных растений. Поглощение длинноволнового света возрастает с увеличением глубины; более 99% света с длинами волн, большими чем 600 нм, поглощается в верхнем слое (до толщины ~ 10 м). Проблема, связанная с недостатком света, неодинаковыми способами разрешена у различных растений.

У диатомовых водорослей, бурых водорослей и динофлагеллят главные светопоглощающие пигменты представлены хлорофиллом с π каротиноидом (гл. 3) *перидином*. (Углеродные и водородные атомы не обозначены, а метильные группы в углеводородной цепи показаны как точки ветвления.)



Динофлагелляты, такие, как *Gonyaulax polyedra* (организм, присутствием которого объясняются «красные приливы»), содержат белок (мол. масса $\sim 32\,000$), с которым связаны четыре молекулы хлорофиллина и одна молекула хлорофилла *a*. Комплекс поглощает в широкой области 400—550 нм, компенсируя таким образом недостаток хлорофилла *a*. Этот растворимый в воде белок прилегает к наружной поверхности мембраны хроматофора, где происходит фотосинтез.

Такую же роль выполняет другая группа пигментов, структурно родственных желчным пигментам (гл. 34), у красных и синезеленых водорослей. Эти пигменты локализируются в *фикобилисомах* — организованных тельцах, имеющих размер $\sim 32 \times 48$ нм и уплощенную поверхность; фикобилисомы располагаются на обращенной в строму стороне тилакоида или фотосинтезирующей ламеллы. Одна фикобилисома приходится на ~ 2000 молекул хлорофилла. Фикобилисомы построены из разного рода фикобилин-протеидов; главные среди них — *фикоэритрин*, *фикоцианин* и *аллофикоцианин*.



Каждый из этих белков состоит из двух субъединиц: α (мол. масса 10 000—20 000) и β (мол. масса 14 000—30 000), причем точные размеры зависят от вида организма. Наиболее распространенная форма сборки — $(\alpha\beta)_3$ или $(\alpha\beta)_6$. Каждая субъединица несет три молекулы своего пигмента. Так, фикоэритрин ($\alpha_6\beta_6\gamma$) содержит 36 молекул фикоэритробилина, связанных с α - и β -единицами, и две молекулы фикоуробилина, связанных с единственной γ -субъединицей. Пигменты представляют собой тетрапирролы с открытой цепью, ковалентно связанные с белком. В качестве примера укажем, что у некоторых красных водорослей соотношение пигментных белков, содержащих фикоэритрин, фикоцианин и аллофикоцианин, составляет 84, 11 и 5% соответственно. На основании физических данных предложена модель строения фикобилисомы (рис. 16.10).

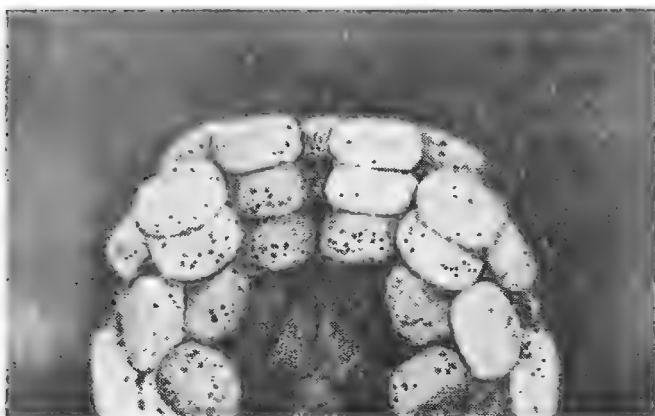


Рис. 16.10. Предполагаемая структура фикобилисомы красной водоросли *Porphyridium cruentum*. Аллофикоцианиновая сердцевина (светлые точки) касается подстилающей фотосинтетической мембраны. R-фикоцианин (темные точки) прилегает к сердцевине и окружен фикозеритрином, лежащим на наружной поверхности (поверхность, обращенная к строме). Сердцевина в норме не могла быть видима, как это представлено на этой срезанной модели, и должна была быть покрыта R-фикоцианином и фикозеритрином. [Gantt E., Lipshultz C. A., Zilinskas B., Biochem. Biophys. Acta, 430, 385, 1976.]

Как показано в табл. 16.3, перенос энергии от наружного компонента структуры фикобилисомы к внутреннему компоненту и затем к хлорофиллу *a* согласуется с электронными свойствами этих молекул. Рис. 16.11 показывает, каким образом благодаря таким системам становится возможным использование разных областей электромагнитного спектра для фотосинтеза у трех типов фотосинтезирующих организмов.

Таблица 16.3

Последовательность переноса энергии в фикобилисоме

	Фико- эритрин	→	R-фико- цианин	→	Аллофи- коцианин	→	Хлоро- филл <i>a</i>
Максимум поглощения, нм	545		551, 618		650		670
Максимум флуоресценции, нм	575		626		660		685

16.3.3. Фотохимический акт

Менее 1% всех имеющихся в хлоропласте молекул хлорофилла непосредственно участвуют в процессе преобразования энергии поглощенных фотонов в химическую энергию. Этот акт совершает-

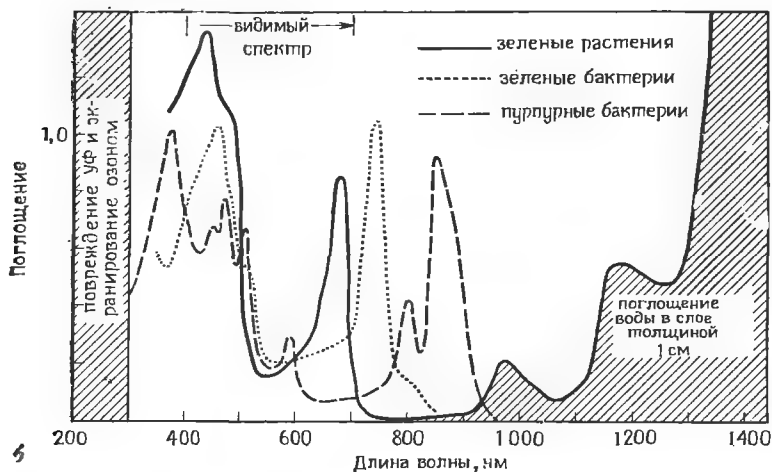
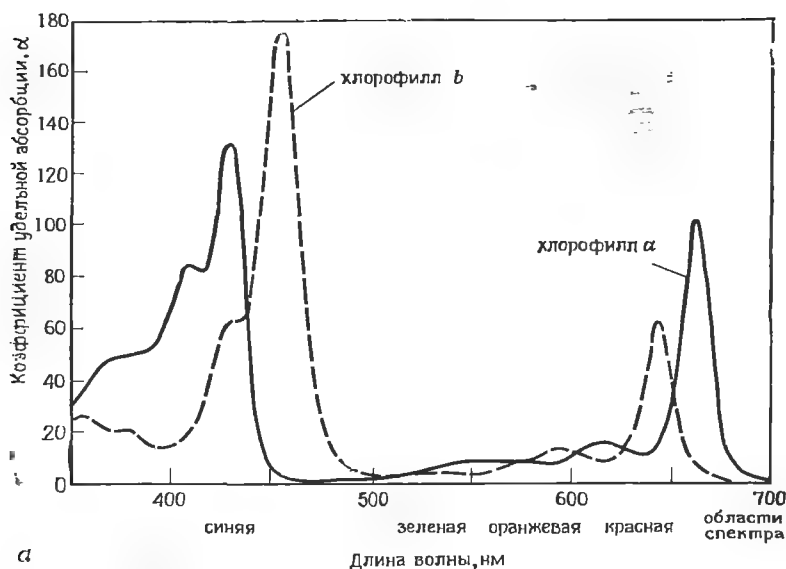
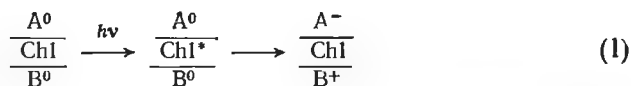


Рис. 16.11. Усиление поглощения света дополнительными пигментами фотосинтезирующих клеток. а — спектр поглощения хлорофиллов а и b, растворенных в этиловом эфире (взято с изменениями из работы [Seliger H. H., McElroy W. D., Light: Physical and Biological Action, Academic Press, Inc., New York, 1965, p. 225]; б — возросшая доступность энергии для фотосинтеза, связанная с поглощением света дополнительными пигментами в областях спектра, где хлорофилл относительно сильно пропускает (взято из работы [Clayton R. K., Molecular Physics in Photosynthesis, Blaisdell Publishing Company, New York, 1966]).

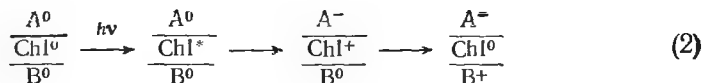
ся в *реакционном центре*, описанном ниже. Остальной хлорофилл, находящийся главным образом в хлорофилл-белковых комплексах, и разнообразные дополнительные пигменты (в основном каротиноиды у высших растений) образуют светоприемную систему, которая используется хлорофиллом реакционного центра. Энергия фотонов, которые могут поглощаться всюду в комплексе, состоящем из 100—250 различных пигментных молекул, быстро передается на специальный хлорофилл реакционного центра с эффективностью $\sim 90\%$, тем самым позволяя фотосинтетической единице функционировать эффективно даже при слабом освещении, т. е. при освещении, составляющем $0,1\%$ светового потока в полдень в ясную погоду. Столь высокая эффективность убедительно свидетельствует о высокой упорядоченности (почти кристаллической укладке) единицы в целом. Отсюда следует, что специфический, принимающий эту энергию хлорофилл должен быть *энергетической ловушкой*; главный максимум в его спектре должен находиться в более длинноволновой области, чем максимумы других компонентов системы. Так и есть в действительности. Толщина фотосинтетической единицы не может превышать нескольких молекул пигмента; слой хлорофилла из 10 молекул практически уже непроницаем для света в области его поглощения. На полном солнечном свету скорость фотосинтеза определяется временем оборота последующего, лимитирующего скорость химического акта; оно составляет $\sim 0,6$ мс между насыщающими вспышками, т. е. 1500 вспышек в 1 с может приходиться на реакционный центр. Только при очень слабом освещении скорость фотосинтеза линейно пропорциональна интенсивности света.

Специфическая роль хлорофилла *a* в реакционном центре заключается в том, чтобы осуществлять фотохимическое разделение окислительных и восстановительных эквивалентов. Такой механизм схематически можно представить следующим образом:



где *A* — потенциальный акцептор электронов и *B* — потенциальный донор электронов, расположенные по разные стороны молекулы хлорофилла (Chl); Chl* — фотоактивированная форма Chl; *A*[−] — восстановленная форма *A*; *B*⁺ — окисленная форма *B*. Простейший механизм для решения такой задачи заключается в выбросе электрона с фотоактивированного хлорофилла с образованием свободнорадикальной формы хлорофилла Chl. Акцептор *A* акцептирует электрон, как только к радикалу хлорофилла с другой его стороны возвращается электрон от *B*. Напомним, что захват фотона при 675 нм может позволить разделение заряда *A*[−]

и B^+ до разности потенциалов порядка 1800 мВ, если процесс был бы эффективен на 100%.



По всей вероятности, бесполезной последующей обратной реакции между A^- и B^+ не происходит в связи с барьером хлорофилла, который возвратился в свое основное состояние. Участие свободного радикала хлорофилла подтверждается наблюдениями характерного сигнала в спектрах ЭПР. В дальнейшем будем считать, что уравнение (2) представляет собой удовлетворительную модель действия первичного механизма. Не вызывает сомнений, что реакция (2) не может быть повторена до тех пор, пока A^- вновь не подвергнется окислению, а B^+ вновь не будет восстановлен. В тилакоидной мембране и бактериальных хроматофорах это достигается благодаря существованию организованной электронтранспортной системы, напоминающей такую систему внутренней мембраны митохондрий; переносчики электронов в этой системе располагаются таким образом, что при прохождении потока электронов становится возможным синтез АТФ.

16.3.4. Бактериальный фотосинтез

Поучительно рассмотреть сначала фотосинтез у бактерий, а затем перейти к его описанию у водорослей и высших растений. Процесс станет более понятен, если будут приняты во внимание простые эволюционные представления. Древнейшие клетки, по всей вероятности, жили в относительно богатой питательными веществами среде. У таких организмов, обитавших в свободной от кислорода восстановительной атмосфере, выработались способы гликолитической генерации АТФ и восстановительных эквивалентов. Древнейшие организованные фотохимические единицы, по-видимому, служили для преобразования электромагнитной энергии в химическую, содержащуюся в легко превращаемой АТФ, но не в восстановленных эквивалентах. Пока среда поставляла достаточные количества глюкозы, не возникало необходимости в развитии способа образования глюкозы. Однако, когда поступление экзогенных углеводов стало сокращаться, способность синтезировать углеводы стала очень полезной. Необходимо было обеспечить форму фиксации CO_2 (серия реакций в табл. 16.1, где показано, что для образования 1 молекулы гексозы необходимо затратить 18 молекул АТФ и 12 молекул NADH). Среда уже содержала источники восстановительных эквивалентов; с возникновением древнейшей

фотохимической машины для продуцирования АТФ или ее эквивалента, например неорганического пирофосфата, стало возможным развитие предшественников современных фотосинтезирующих бактерий. Эти организмы процветали потому, что были способны использовать два, по существу, независимых процесса

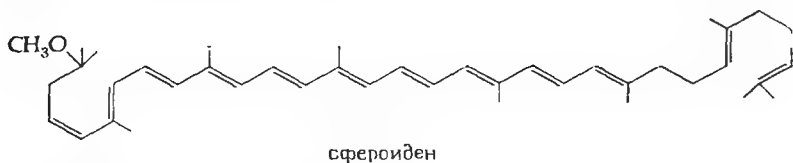


Простейшую форму H_2A представляет собой H_2 ; как известно, организмы, обладающие гидрогеназой, могут использовать водород для восстановления NAD^+ . Другие утилизируют для этой цели неорганические соединения, такие, как S^{2-} или $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (как отмечалось ранее). Такие организмы, как различные виды *Rhodospirillum*, зеленые бактерии и др., которые располагают всеми ферментами CO_2 -фиксирующей системы, описанной ранее, утилизируют образуемые химическим путем восстановительные эквиваленты и генерируемый фотосинтетически АТФ для синтеза углеводов, требуемых для роста и метаболизма. Поэтому интересно заметить, что многие из этих организмов используют ту же самую NAD -зависимую глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу для гликолиза в темноте и для фиксации CO_2 на свету.

16.3.4.1. Фотосинтетический центр бактерий

Аппарат фотосинтеза у этих организмов устроен проще, чем у высших растений. По существу, в фотореакционный центр электрон поступает от соединения с потенциалом средней точки E' , ненамного превышающим потенциал митохондриального цитохрома c , и с энергией, достаточной для восстановления пиридиннуклеотида или флавопротеида. В связи с тем что бактериальные хроматофоры содержат намного меньше светособирающего хлорофилла, чем хлоропласты высших растений, появилась возможность для разделения и очистки самого реакционного центра из нескольких видов фотосинтезирующих бактерий, а именно *Rhodospirillum rubrum* и *Chromatium*. В каждом случае реакционный центр состоит из одной молекулы в известной степени неполярного белка, (мол. масса $\sim 73\,000$), построенного из трех неидентичных субъединиц (с мол. массами по 21 000, 24 000 и 28 000 соответственно). С этим белком связаны: две молекулы бактериохлорофилла, одна молекула димера бактериохлорофилла (BChl), две молекулы бактериофеофитина (бактериохлорофилл, лишенный Mg^{2+}), один ион

Fe^{2+} , две молекулы убихинона (разд. 12.4) и одна молекула каротиноида, а именно сфероидена.



Каротиноид реакционного центра не является составной частью светособирающего устройства и редко входит в число тех каротиноидов, смесь которых содержится в мембране. Каротиноид реакционного центра, по-видимому, защищает активированный хлорофилл в том случае, если последний не способен передать электрон другим компонентам центра и подвергается опасности саморазрушения в результате теплового повреждения в триплетном состоянии. В таких обстоятельствах каротиноид принимает энергию от активированного хлорофилла и затем либо подвергается окислению, либо флуоресцирует. Absorption фотона центром инициирует процесс *циклического фотофосфорилирования*. Как описано ниже, активированный хлорофилл служит и как первичный донор электронов, и как конечный акцептор электронов в цикле. Каждый поглощенный фотон вызывает прохождение одного электрона по циклу. При этом два протона выталкиваются наружу. Их возвращение с помощью сопрягающего фактора АТФазы сопровождается генерацией одного АТФ.

В пределах 10 пс после поглощения фотона находящимся в фотосинтетическом центре В-феофитином (максимум поглощения при 530 нм) наблюдается «выцветание» в ближней инфракрасной области при 865 нм — максимуме поглощения $(\text{BChl})_2$. Полагают, что это явление означает перенос энергии от активированного В-феофитина к $(\text{BChl})_2$, вероятно, с образованием $\text{BChl}^+ \cdot \text{BChl}^-$, стабилизируемого сфероиденом. Менее чем через 100 пс после этого бактериохлорофилл переходит в свободнорадикальное состояние $(\text{BChl})_2^{\cdot+}$, отдавая электрон железоубихиноновому комплексу, который восстанавливается до $\text{Fe}^{2+} \text{UQ}_2^-$, и является, таким образом, первичным акцептором электронов этой системы. В течение нескольких микросекунд окисленный хлорофилл принимает электрон от молекулы цитохрома c_2 и свободный радикал $(\text{BChl})_2^{\cdot+}$ возвращается в основное состояние. Как видно из рис. 16.12, перенос электрона затем осуществляется через хинон и цитохром типа b к цитохрому c_2 , где цикл завершается. В результате такого переноса электрона образуется одна молекула АТФ, причем механизм этого процесса, как и у митохондрий и хлоропластов, включает векторное выделение протона и Ca^{2+} -чув-

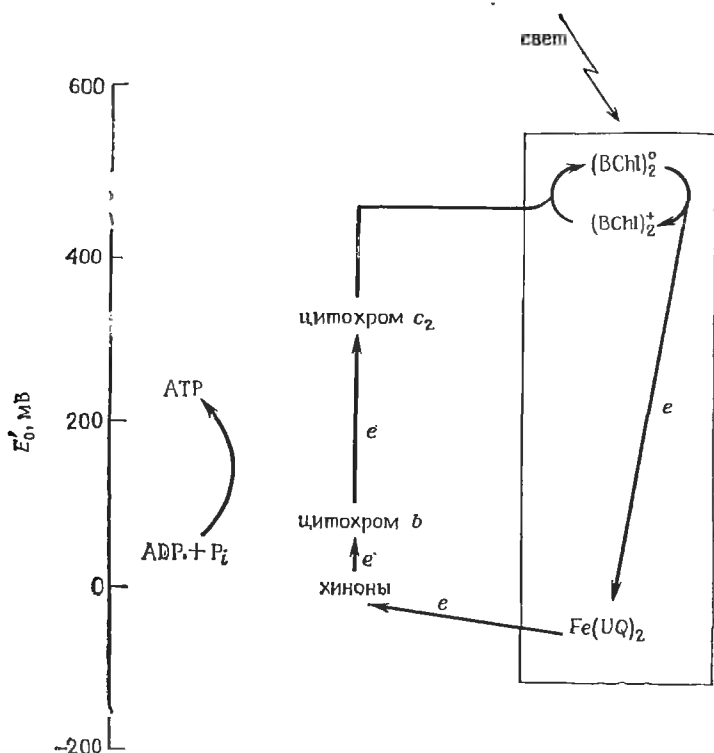


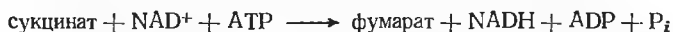
Рис. 16.12. Схематизированное представление о роли реакционного центра у фотосинтезирующих бактерий; показан перенос электронов при циклическом фотофосфорилировании. (Все значения приближительные.)

ствительную АТФазу. Это будет более подробно изложено ниже (разд. 16.4.2). Поскольку квант света при 890 нм — максимуме поглощения бактериохлорофилла — эквивалентен 32 000 кал/моль, он вполне достаточен для того, чтобы обеспечить образование одной молекулы АТФ.

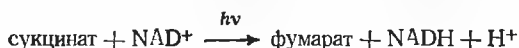
16.3.4.2. Транспорт электрона в бактериальном фотосинтезе

Подобно эукариотным фотосинтезирующим организмам, фотосинтезирующие бактерии связывают CO_2 с образованием углеводов, используя в качестве двигателей этого процесса восстановленные пиридиннуклеотиды и АТФ. АТФ, как было показано, вырабатывается путем циклического фотофосфорилирования. Однако эти организмы не выделяют кислород в процессе фотосинтеза; они неспособны утилизировать энергию света для фотолиза воды и

использовать образующийся при этом водород в качестве восстановительного агента, как это делают эукариоты. Поэтому им необходим экзогенный источник химических восстановительных эквивалентов. Многие восстановители, например сукцинат, могут выполнять эту роль, несмотря на то что E'_0 для их окисления недостаточен для восстановления NAD^+ . Это становится возможным благодаря функциональной равноценности — в фотосинтетической мембране и в митохондриях — ΔE , $\Delta \Psi$ и $\sim P$. Анаэробно в темноте эти мембраны могут осуществлять реакцию



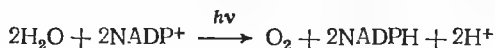
На свету нет необходимости в добавлении извне АТФ; фотоактивированная мембранная система может катализировать реакцию



Наконец, следует заметить, что некоторые фотосинтезирующие микроорганизмы способны утилизировать газообразный H_2 , как таковой, в качестве метаболического восстановителя. Производящий эту реакцию фермент, *гидрогеназа*, подобный обнаруженному у *Clostridium pasteurianum*, осуществляет восстановление железосеропротейда (ферредоксина) у этих видов, и в свою очередь электроны от ферредоксина могут передаваться к флавопротеиду, который восстанавливает NAD^+ . Подобная система имеется и у сине-зеленых водорослей, несмотря на то что они, как отмечалось ранее, способны утилизировать в фотосинтезе H_2O в качестве восстановителя NADP^+ .

16.4. Фотохимический процесс у водорослей и высших растений

Приспособлением, которое позволило растениям достичь более высоких стадий эволюции, был процесс, давший им независимость от внешних источников химических восстановителей, а именно удивительный фотохимический процесс, в ходе которого повсеместно распространенная вода может восстанавливать пиридиннуклеотиды.



Таким образом, у водорослей и высших растений фотохимическая система не только продуцирует АТФ, но также движет восстановление NADP^+ за счет H_2O . E'_0 для этой реакции, составляющее 1,2 В, эквивалентно примерно +55 000 кал/моль в расчете на NADP^+ . Поскольку 2 эйнштейна света при 675 нм соответствуют $\sim 1,85$ эВ, или 84 000 кал, они могут обеспечить такой процесс

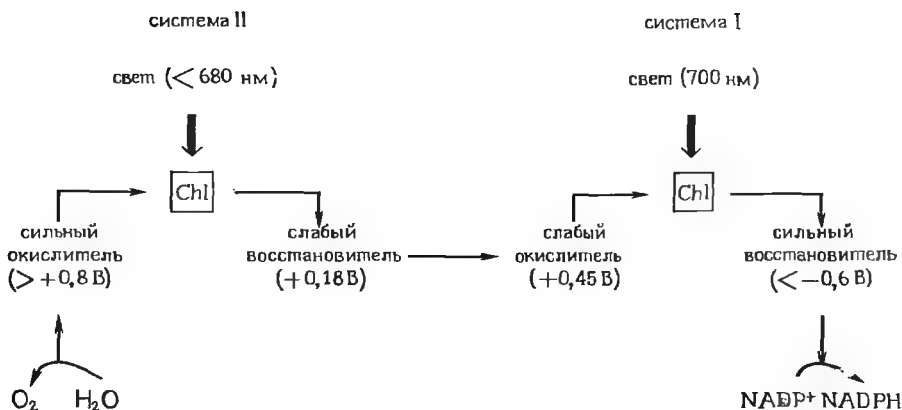
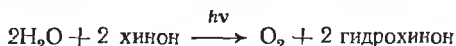


Рис. 16.13. Общая модель кооперативного действия двух центров фотохимических реакций в растительных хлоропластах. Стрелки показывают направление движения потока электронов; цифры в скобках — значения E'_0 .

при условии наличия необходимых приспособлений. В реальном механизме используются четыре кванта света ($\sim 168\,000$ кал), для того чтобы совершить этот процесс, который осуществляется при участии двух электротранспортных систем, как это показано на рис. 16.13.

16.4.1. Перенос электронов при фотосинтезе

Одним из первых вкладов в понимание природы транспорта электронов при фотосинтезе послужило обнаружение так называемой реакции Хилла. Оказалось, что при освещении хлоропластов происходит восстановление искусственных акцепторов, таких, как хиноны, ферроцианид или метгемоглобин, что сопровождается выделением O_2 и осуществляется без участия CO_2 или пиридиннуклеотидов. Фактически наблюдение Хилла было одним из самых ранних указаний на то, что восстановление CO_2 не обязательно должно быть связано с механизмом выделения O_2 . Суммарный процесс таков:



С метгемоглобином (ферригемоглобином) в качестве акцептора удалось показать, что на каждую выделенную молекулу O_2 , восстанавливаются четыре молекулы метгемоглобина. Вместе с тем, когда водоросли, обладающие гидрогеназной активностью, обрабатывают гербицидом дихлорфенилдиметилмочевинной (ДХММ),

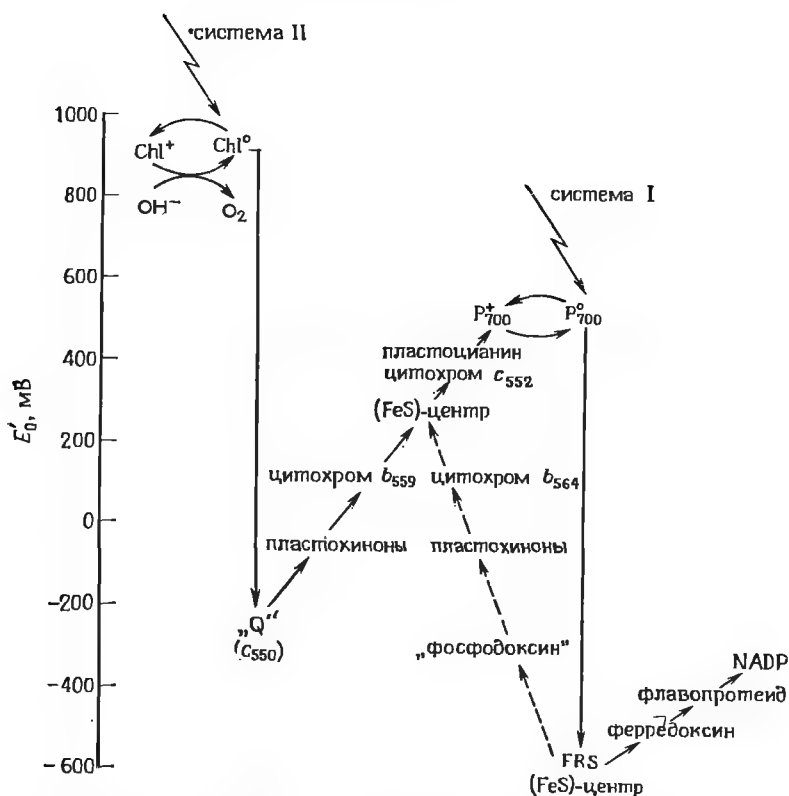


Рис. 16.14. Ориентировочная схема переноса электронов в фотосинтетической единице растений. Стрелки показывают направление потока электронов; штриховые стрелки — путь электрона во время циклического фосфорилирования. FRS — вещество, редуцирующее ферредоксин. Детали см. в тексте.

они перестают выделять O_2 на свету, но в присутствии H_2 фиксируют CO_2 , откуда следует, что сам по себе этап выделения O_2 не обязателен для конечного химического процесса.

Теперь уже не вызывает сомнений, что фотосинтетический аппарат водорослей и хлоропластов всех высших растений действительно построен так, как это схематически представлено на рис. 16.13: O_2 продуцируется, а NADP^+ восстанавливается так, как это указано; синтез АТФ совершается в сопряжении с этими согласованными переносами электронов, и система не утратила также своей древнейшей способности к осуществлению циклического фосфорилирования. Детали этой схемы в той форме, в какой они сейчас представляются, показаны на рис. 16.14.

16.4.1.1. Фотосинтетические реакционные центры в хлоропластах

Концепция двух различных реакционных центров впервые была сформулирована на основании того факта, что свет с длиной волны >700 нм более не выступает в качестве движущего фактора фотосинтеза, в то время как свет при 700 и 680 нм, даваемый одновременно или поочередно, оказался значительно более эффективным, чем сумма результатов действия каждого из них в отдельности (*эффект стимуляции*). В пределах каждой фотосинтетической единицы имеется одна молекула хлорофилла *a*, который неотличим химически путем простых процедур извлечения, но который, будучи в своей естественной среде, может быть обесцвечен светом с длиной волны 700 нм (максимум поглощения хлорофилла *a* находится при ~ 683 нм) и тогда проявляется, судя по сигналу ЭПР, как свободный радикал. Далее, эта молекула хлорофилла уникальна в том отношении, что она не может быть превращена в феофитин путем продолжительной экспозиции на свету, а также не может быть окислена хлориридатом. Путем титрования феррицианидом показано, что для этого хлорофилла $E'_0 = 0,47$ В. Этот «пигмент», обозначаемый как P_{700} , и является фотореакционным центром системы I. Особые свойства хлорофилла P_{700} определяются не отличиями его химической структуры от других молекул хлорофилла *a*, а тем фактом, что он располагается в непосредственной близости от специфических молекул (не хлорофилла *a*), которые, будучи фотоактивированными, служат в качестве доноров и акцепторов электрона. Были получены препараты, содержащие одну молекулу P_{700} на всего лишь 30 молекул хлорофилла *a*, но до сего времени не изолирован очищенный препарат, по своим свойствам аналогичный бактериальному центру фотореакции. Комплекс I, хлорофилл-*a*-белок (разд. 16.3.2), несомненно, является светособирающей формой хлорофилла для этого реакционного центра.

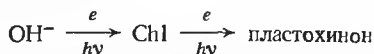
Еще нет возможности для описания фотоцентра системы II с помощью физических понятий. Предполагают, что комплекс II, включающий хлорофиллы *a*, *b* и белок, служит светособирающим устройством в фотоцентре II; здесь, как и в центре I, каротиноиды выполняют вспомогательную роль. Для выделения O_2 каким-то образом необходимо наличие марганецсодержащего белка и Cl^- . В настоящее время неизвестна ни природа хлорофилла, входящего в центр II, ни природа компонентов его непосредственного окружения.

16.4.1.2. Электронпереносящие цепи

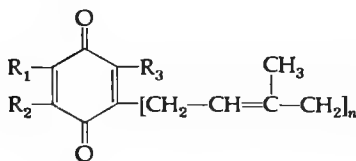
На рис. 16.14 суммированы современные представления об электронпереносящих цепях фотосинтетического аппарата. Все участвующие молекулы либо прочно вмонтированы в тилакоидную

мембрану, либо слабо с ней связаны. Только аденин- и пиридин-нуклеотиды растворены в жидкости стромы, обладая свободой связывания с теми ферментами, с которыми они реагируют, и соответственно свободой диссоциации из этих соединений. Для удобства изложения эту систему электронного транспорта можно рассмотреть как построенную из четырех сегментов: тех, которые направлены к каждому из реакционных центров, и тех, которые ведут от него.

Система II. Наименее изученный аспект фотосинтеза — это выделение O_2 . Обычно приводимое значение E'_0 для этого четырех-электронного окисления H_2O активированным хлорофиллом *a* на самом деле складывается из неодинаковых величин для каждой из четырех одноэлектронных стадий. Поскольку не было найдено интермедиатов, можно полагать, что две молекулы H_2O или два OH^- -иона связываются в реакционном центре и покидают его только как O_2 аналогично тому, как этот происходит при восстановлении O_2 цитохромоксидазой. Хлорофилл не обязательно непосредственно окисляет воду, но никакой иной агент не был обнаружен в качестве участника этого процесса. На основании одного из исследований системы II, подвергнутой действию коротких лазерных вспышек, предположили, что непосредственным восстановителем P_{680}^+ может служить цитохром b_{559} и что кислород выделяется в процессе восстановления цитохрома b_{559} . Учитывая значения окислительно-восстановительных потенциалов цитохромов b , это предположение трудно принять. Нет уверенности и в отношении природы непосредственного акцептора электронов от хлорофилла в этом реакционном центре. Полагают, что вещество, обозначаемое Q (потому что оно вызывает гашение флуоресценции фотоактивного центра), располагается в непосредственной близости. Поскольку на это вещество влияет свет с длиной волны 550 нм, его также называют цитохром c_{550} , хотя оно не относится к цитохромам. Последние данные свидетельствуют о том, что этот компонент может представлять собой прочно связанную молекулу пластохинона; экспериментальные значения E'_0 для этого акцептора варьируют от -300 до -125 мВ. Практически не вызывает сомнений, что этот акцептор может вновь окисляться хиноновым пулом, главным образом пластохиноном, хотя возможно существование промежуточного переносчика электронов. Ряд наблюдений убедительно показывает, что образование АТФ происходит в связи с общим процессом



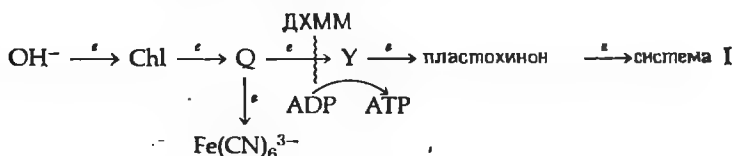
Восстановление пластохинона блокируется ДХММ, который предотвращает также сопряженное образование АТФ, но не реакцию Хилла, т. е. фотосинтетическое восстановление феррицианида, со-



	R ₁	R ₂	R ₃	n
убихиноны	CH ₃ O—	CH ₃ O—	CH ₃	6–10
пластохиноны	CH ₃ —	CH ₃ —	H	6–10
витамины К	H	H	CH ₃	4–9

Рис. 16.15. Структура некоторых хинонов, найденных в хлоропластах. Строение убихинонов и пластохинонов показано выше; витамины К относятся к нафтохинонам (гл. 51).

пряженное с выделением O₂. Если синтез АТФ происходит на этом отрезке общего процесса, то, по-видимому, можно было бы следующим образом описать процесс в целом:



Система II до P₇₀₀. Электроны от системы II попадают в цепь, напоминающую митохондриальную, а именно от хинона к цитохрому *b*, от него к цитохрому *c* и затем к купропротеиду и терминальному акцептору. Из пула имеющихся пластохинонов основная масса может быть экстрагирована без повреждения системы. По-видимому, требуется по крайней мере по одной молекуле пластохинонов А и С. Эти молекулы находятся в равновесии с более крупными пулами хинонов, которые представлены на рис. 16.15. Восстановленный хинон в свою очередь восстанавливает цитохром *b*-типа, а именно цитохром *b*₅₅₉. Последний, будучи восстановленным, также становится «активированным» аналогично тому, как это происходит с митохондриальным цитохромом *b*. Активация может выражаться в появлении второй формы того же самого соединения; эта форма имеет слегка измененный спектр поглощения и при титровании феррицианидом — более высокий потенциал средней точки, нежели неактивированная форма.

По меньшей мере три различных вещества находятся на пути электрона от цитохрома *b* к окисленному хлорофиллу. Одно из

них представлено высокопотенциальной формой железосеропротейда ($E'_0 = 290$ мВ), который прочно связан с мембраной и легко восстанавливается добавленными извне гидрохинонами. Полагают, что этот компонент располагается между цитохромами b и c , как в митохондриях. Второй компонент — это цитохром c -типа с максимумом поглощения при 552 нм; это вещество обязательно присутствует в фотосинтетических тканях и часто обозначается как цитохром f . Восстановление этого цитохрома блокируется антимицином А. В отличие от водорастворимого митохондриального цитохрома c цитохром c_{552} гидрофобен и включен в качестве интегрального белка в фотосинтетическую мембрану. Наконец, в хлоропластах высших растений (но не у водорослей или бактерий) имеется пластоцианин (мол. масса $\sim 10\,400$), который содержит один атом меди на молекулу; медь легко удаляется цианидом. Медь удерживается благодаря связям с имидазольными атомами азота остатков гистидина 38 и 88 и с одним непротонированным атомом азота в неидентифицированном пептидном звене. Принято считать пластоцианин электронным переносчиком между цитохромом c_{552} и хлорофиллом по аналогии с митохондриями и потому, что E'_0 для пластоцианина на 40 мВ выше, чем для цитохрома c_{552} . Однако этот пластоцианин не вмонтирован в мембрану; он или слабо удерживается на внутренней поверхности тилакоидной мембраны, или растворен в жидкости внутреннего пространства тилакоидов. Несмотря на это, он окисляется, когда P_{700} подвергается освещению при 77 К, и вновь восстанавливается при освещении хлоропластов светом с длиной волны 675 нм. Скорости этих обоих процессов, по-видимому, совпадают с таковыми для цитохрома b_{552} и соответствуют физиологическим потребностям, хотя физическое местонахождение пластоцианина служит указанием против его роли как непосредственного восстановителя хлорофилла реакционного центра I. Продвижение электрона вдоль этой цепи сопровождается генерацией молекулы АТФ аналогично образованию АТФ в сегменте комплекса III цепи митохондриального электронного транспорта. $\Delta E'_0$ пары цитохром b_{559} и P_{700} составляет около 400 мВ.

Восстановление $NADP^+$. В результате освещения P_{700} ($E'_0 = +470$ мВ) становится возможным восстановление внологенов — красителей с потенциалом средней точки — 700 мВ; это означает, что разность потенциалов составляет 1200 мВ. Непосредственными акцепторами электрона от P_{700} , по-видимому, являются два связанных в мембране железосеропротейда из категории $(FeS)_4$ с $E'_0 = -590$ и 550 мВ соответственно, известных теперь под названием *ферредоксин-восстанавливающих компонентов* (ФВК). Электроны продвигаются от них к пулу более легко экстрагируемых ферредоксинов типа $(FeS)_2$.

У дефицитных по железу клеток многих видов флаводоксина (разд. 13.2), по-видимому, заменяют ферредоксин в этой системе; флаводоксина всегда присутствуют вместо ферредоксина у некоторых красных водорослей. Наконец, электроны проходят через флавопротеид (ферредоксин-NADP-редуктазу) к NADP^+ , тем самым завершая процесс, в результате которого H_2O используется для восстановления NADP^+ .

16.4.2. Фотосинтетическое фосфорилирование

16.4.2.1. Циклическое фотофосфорилирование в растениях

Необходимы как минимум 18 АТФ и 12 NADPH, чтобы совершился синтез гексозы. Если функционирует модифицированная система, включающая C_4 -челнок, требуются еще два дополнительных АТФ. Более того, клетке требуется АТФ и для удовлетворения многих других нужд. Как показано на рис. 16.14, система I также способна к осуществлению механизма циклического фотофосфорилирования, аналогичного тому, которое свойственно фотосинтезирующим бактериям. Неясно, начинается ли возврат электронов с ФВК или с растворимого ферредоксина, но во всяком случае включено еще одно вещество неизвестной природы, названное *фосфодоксином*, и особый цитохром *b*-типа b_{564} , от которого электроны переносятся к цитохрому *f* и пластоцианину и в обратном направлении к P_{700} , с образованием АТФ, происходящим в связи с этим процессом. Когда практически весь NADP восстанавливается, он дает сигнал обратной связи для торможения потока электронов из фотосистемы I, но циклический транспорт электронов может с выгодой беспрепятственно продолжаться при условии обеспечения притока ADP и P_i . Возможно также, что модифицированная система I, которая служит для циклического фотофосфорилирования, совершенно отделена и не зависит от тех единиц системы I, которые сопряжены с системой II.

16.4.2.2. Фотофосфорилирование

Поток электронов через фотосинтетическую электронтранспортную цепь приводит к генерации АТФ. Эти два процесса сопряжены не столь прочно, как в митохондриях; для выделения O_2 и восстановления NADP присутствие ADP и P_i не является абсолютно необходимым. Однако в присутствии системы, окисляющей NADPH, разобщающие агенты вызывают существенное увеличение скорости фотосинтетического выделения O_2 и восстановления NADP, иногда даже в 3—4 раза. Стало быть, сопряжение достаточно эффектив-

но. Возможно, что такое устройство выгодно в физиологическом смысле. В то время как окисление NADH в митохондриях становится бесполезным, если не происходит генерации АТФ, несколько менее тесное сопряжение в хлоропластах позволяет аппарату обеспечить клетку вполне достаточным притоком как АТФ, так и NADPH, причем до известной степени независимо друг от друга. Как показано на рис. 16.14, синтез АТФ происходит сопряженно с окислением двух главных цитохромов *b* цитохромами *c* и, вероятно, также в связи с действием системы II.

Механизм фотофосфорилирования чрезвычайно напоминает механизм транспорта электронов в митохондрии, и доводы в пользу гипотезы движения протонов (гл. 12) еще более убедительны в случае хлоропластной системы. К числу некоторых общих свойств окислительного и фотосинтетического фосфорилирования относятся следующие:

- 1) олигомицин и флорицин ингибируют и электронный транспорт, и фосфорилирование;
- 2) антимицин А блокирует окисление цитохромов *b*;
- 3) все ингибиторы электронного транспорта препятствуют фосфорилированию;
- 4) одни и те же липофильные фенолы действуют как разобщители;
- 5) оба процесса зависят от целостности мембраны. Действие разобщителей заключается в том, что они транспортируют протоны обратно через мембрану; в хлоропластах NH_3 и CH_3NH_2 могут действовать также как липофильные фенолы.

Транспорт электронов в фотосинтетической мембране приводит к возникновению $\Delta\mu\text{H}^+ \sim 3,0$, но путем перекачивания протонов из стромы в тилакоидный матрикс, занимающий очень маленький объем (рис. 16.8). Напомним, что в аналогичных процессах, связанных с митохондриальным электронным транспортом, протоны движутся внутрь межмембранного пространства митохондрии и из митохондрии, и таким путем происходит их сильное разбавление и забуферивание. Очевидно, поведение тилакоидов больше напоминает поведение вывернутых субмитохондриальных частиц, приготовленных путем озвучивания, у которых выбрасываемый протон удерживается в малом объеме, так что устанавливается существенный градиент $\Delta\mu\text{H}^+$, равно как и $\Delta\psi$. В процессе тилакоидного фосфорилирования $\Delta\mu\text{H}^+$ может достигать 150—200 мВ, в то время как величина $\Delta\psi$ может составлять ~ 100 мВ, обеспечивая тем самым $\Delta\mu\text{H}^+ \geq 250$ мВ. Роль $\Delta\mu\text{H}^+$ была продемонстрирована следующим образом. Хлоропласты в темноте на короткое время помещали в среду с рН 4,5, содержащую проникающий нон, такой, как сукцинат, подкисляя тем самым внутреннюю область тилакоида. Когда хлоропласты (по-прежнему в темноте) переносили

в относительно щелочной раствор (рН 8,3), содержащий ADP и P_i , ΔpH некоторое время составляло 4 единицы, или 240 мВ. При этом система генерирует 100 молекул АТР на молекулу хлорофилла, проявляя совершенно изумительные свойства.

Локализация ряда компонентов в тилакоидной мембране установлена: цитохром f , пластоцианин и генератор кислорода находятся на внутренней стороне мембраны; ферредоксин-NADP-редуктаза и ее субстраты расположены на обращенной в сторону стромы стороне. Поверхность мембраны, обращенная к строме, усеяна частицами сопрягающего фактора CF_1 (мол. масса 325 000), который очень похож на соответствующий фактор митохондрий. Он также состоит из объединенных попарно пяти неидентичных субъединиц α , β , γ , δ и ϵ . Субъединица δ необходима для прикрепления к мембране у CF_0 гидрофобного интегрального мембранного белка, состоящего по меньшей мере из трех субъединиц. Будучи изолированным, CF_1 обнаруживает лишь умеренную гидролитическую АТРАЗную активность, в то время как деградированная форма, которая состоит только из $\delta\beta$ единиц, обладает выраженной АТРАЗной активностью, которая ингибируется ϵ -единицами. Освещение мембраны, добавление АТР или повышение $[H^+]$ вызывают глубокое конформационное изменение в CF_1 . Это проявляется в сильном возрастании количества обмениваемых водородов в CF_1 и доступности ранее недостижимых аминогрупп единиц δ , β и γ для действия соответствующих реагентов. Одновременно открывается несколько сульфгидрильных групп.

Препараты изолированного фермента содержат две прочно связанные молекулы ADP и катализируют реакцию аденилаткиназного типа ($2ADP \rightarrow ATP + AMP$). Однако считают, что образование АТР происходит, так же как в митохондриях, путем фосфорилирования ADP.

В освещенных хлоропластах протоны транспортируются через мембрану в одном или более сегментах электронтранспортной цепи; они возвращаются из матрикса тилакоида в строму хлоропласта, проходя канал в CF_0 и попадая на обратимую АТРАЗу, расположенную на наружной поверхности тилакоидной мембраны, где ΔpH^+ движет синтез АТР.

Истинная скорость фотосинтетической генерации АТР в живой клетке, связанной с одновременно идущим процессом образования NADPH, остается невыясненной. Для синтеза углеводов требуется минимальное соотношение $3ATP:2NADPH$. Все другие проявления клеточной активности должны, по-видимому, способствовать увеличению потребности в АТР. Можно получить хлоропласты, дающие указанное соотношение 3:2, но неизвестно, является ли это отражением продуцирования более чем одной молекулы АТР при прохождении пары электронов через системы I и II,

или же это отражает колебания скорости циклического фотофосфорилирования.

16.4.3. Регуляция фотосинтеза

Система фиксации CO_2 функционирует при наличии целого ряда приспособлений для автоматической саморегуляции, благодаря чему достигается высокая эффективность фиксации CO_2 при обычной его концентрации в атмосфере и при относительно низкой освещенности и обеспечивается возможность избежать невыгодных реакций в темноте. Контрольные механизмы заложены в свойствах некоторых участвующих в процессе ферментов. Высокая концентрация рибулозодифосфат-карбоксилазы в сочетании с присущим ей большим числом оборотов способствует тому, что ограничивающим фактором для большей части дневного времени является свет, а не $[\text{CO}_2]$, хотя рост большинства растений может стимулироваться поднятием парциального давления CO_2 .

Особенно изящны те контрольные приспособления, которые основаны на свойствах, присущих освещенной тилакоидной мембране; она обеспечивает строми хлоропласта восстановительными эквивалентами, одновременно поднимая ее рН по мере того, как протоны переносятся внутрь тилакоида. В то же самое время, как отмечалось ранее, освещение служит причиной для конформационного изменения АТФазы, благодаря которому она превращается в активную синтетазную форму. По крайней мере три участвующих в фотосинтезе фермента содержат сульфгидрильные группы, легко окисляемые кислородом в темноте, что приводит к инактивации ферментов, а именно фосфорibuлокиназы, фруктозо-1,6-дифосфатазы и обеих NAD^{+} - и NADP^{+} -зависимых глицеральдегидфосфатдегидрогеназ. Особенно поразительны свойства фруктозо-1,6-дифосфатазы, которая состоит, вероятно, на 15% из остатков цистенина. *In vitro* каждый из этих остатков быстро вновь активируется при добавлении сульфгидрильного соединения. Специфический восстановитель не был идентифицирован, но известно, что вскоре после освещения восстановительные эквиваленты, продуцируемые электронтранспортной цепью, используются для повторной активации этой группы ферментов.

Наряду с этим активность рибулозодифосфат-карбоксилазы регулируется ее субстратом — негативным эффектором при высоких концентрациях, в то время как NADPH является сильным положительным эффектором. Так, при концентрации рибулозодифосфата 1,0 ммоль/л фермент инертен, если $[\text{NADPH}]/[\text{NADP}^{+}] = 0,5$, но максимально активен, если при этом отношение равно 2,0, а концентрация субстрата составляет 0,2 ммоль/л. Поскольку NADP в освещенных хлоропластах поддерживается преимущественно в восстановленном состоянии, фермент может проявлять пол-

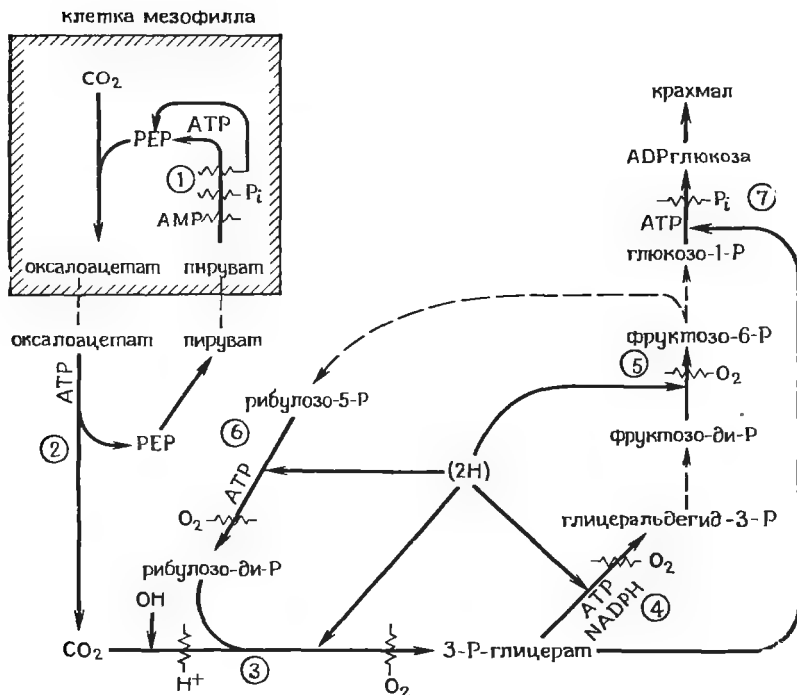


Рис. 16.16. Некоторые регуляторные контрольные механизмы фотосинтеза у C_4 -растений. Показан основной путь движения углерода. Ферменты, контролирующие отдельные локусы, таковы (цифры в кружках): 1 — пируват, ортофосфатдикиназа, 2 — фосфоенолпируваткарбоксикиназа, 3 — рибулозодифосфаткарбоксилаза, 4 — глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, 5 — фруктозодифосфатаза, 6 — 5-фосфорибулокиназа, 7 — ADPглюкозопирофосфорилаза. Там, где O_2 обозначен как ингибитор, он способствует усилению аэробного окисления сульфгидрильных групп ферментов; повторная активация достигается восстановителем $(2H)$, поступающим из электронпереносящей системы, наряду с ATP и NADPH, необходимыми для различных, обозначенных на рисунке реакций. PEP — фосфоенолпируват. См. подробности в тексте.

ную активность. Эти соотношения особенно важны в связи с тем, что оксигеназная и карбоксилазная активности проявляют одинаковую зависимость. В темноте фермент не расходует впустую рибулозо-1,6-дифосфат.

В хлоропластах, располагающих C_4 -путем, действуют к тому же дополнительные контрольные механизмы (рис. 16.16). И пируватортофосфат-дикиназа, и фосфоенолпируваткарбоксикиназа ингибируются своими продуктами, первая — AMP, фосфоенолпируватом и P_i , вторая — оксалоацетатом. Далее активность дикиназы исчезает (период полупревращения 15 мин), когда растения

переносят в темноту, и с той же скоростью вновь появляется на свету. В пределах освещенности до 2000 Вт/м^2 уровень ферментной активности в общем пропорционален интенсивности света. Инактивированная дикиназа регенерирует в результате катализируемого ферментом восстановления дисульфидной связи, причем восстановительная сила опять-таки генерируется в мембранной электротранспортной системе.

Возрастание рН стромы при освещении, связанное с переносом протона в тилакоидное пространство, также действует подобно метаболическому переключателю свет—темнота. При снижении рН стромы $< 7,4$ фиксация CO_2 не происходит, в то время как процесс достигает максимальной скорости при рН $\sim 8,1$. Это объясняется значительным снижением $K_m^{\text{CO}_2}$ для карбоксилазы в ответ на увеличение рН и отчетливым приростом V_{max} для фруктозо-1,6-дифосфатазы.

У разнообразных представителей фотосинтезирующих бактерий регенерация рибүлозодифосфата под действием фосфорибүлокиназы выполняет роль ключевого контрольного механизма; фермент проявляет сигмондную кинетику для ингибирования АМР, которое снимается под действием как АТР, так и NADH, но не NAD^+ . Таким образом, ответ тилакоидной мембраны на освещение представляет собой как бы автоматический выключатель, поворот которого запускает ферменты, требующиеся для процесса фиксации CO_2 в углеводы.

16.4.3.1. Хлоропласты и митохондрии

Множество сходных свойств у митохондрий и хлоропластов свидетельствует о наличии общих эволюционных предшественников, древнейшими из которых, естественно, были те, которые обладали хлоропластами. Одна из групп ныне живущих организмов, может быть, представляет современных потомков древней переходной формы. Пурпурные несерные бактерии являются единственными организмами, которые используют одну и ту же электротранспортную цепь и для дыхания, и для фотосинтеза; эта система представлена на рис. 16.17.

16.4.3.2. Квантовый выход фотосинтеза

Согласно схеме, изображенной на рис. 16.14, требуются по крайней мере четыре кванта в каждом из двух реакционных центров, чтобы осуществилось выделение одной молекулы O_2 с образованием двух молекул NADPH, т. е. всего восемь квантов. Принимая среднюю энергию абсорбированных фотонов равной $40\,000 \text{ кал/эйнштейн}$, можно рассчитать, что для образования одной молекулы O_2 расходуется в сумме $320\,000 \text{ кал}$. Если также

- Olson J. M., Hind G.*, eds., Chlorophyll-Proteins, Reaction Centers, and Photosynthetic Membranes, Brookhaven Symposia in Biology, No. 28, Brookhaven National Laboratory, Upton, N. Y., 1977.
- Rabinowitch E., Govindjee*, Photosynthesis, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1969.
- San Pietro A., Greer F. A., Army T. J.*, eds., Harvesting the Sun, Academic Press, Inc., New York, 1967.
- Stewart W. D. P.*, ed., Nitrogen Fixation by Free-living Microorganisms, Cambridge University Press, Cambridge, 1975.
- Vernon L. P., Seely G. R.*, eds., The Chlorophylls, Academic Press, Inc., New York, 1966.

Обзорные статьи

- Anderson J. M.*, The Molecular Organization of the Thylakoid, *Biochim. Biophys. Acta*, **416**, 191—235, 1975.
- Arnon D. I., Buchanan B. B.*, Ferredoxin and Photosynthesis, *Horiz. Biochem. Biophys.*, **1**, 303—344, 1974.
- Bearden A. J., Malkin R.*, Primary Photochemical Reactions in Chloroplast Photosynthesis, *Q. Rev. Biophys.*, **7**, 131—177, 1974.
- Bendall D. S., Hill R.*, Heme-Proteins in Photosynthesis, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **19**, 167—248, 1968.
- Bishop N. I.*, Photosynthesis: The Electron Transport System of Green Plants, *Annu. Rev. Biochem.*, **40**, 161—196, 1971.
- Bogorad L.*, Phycobiliproteins and Complementary Chromatic Adaptation, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **26**, 369—401, 1975.
- Bolton J. R., Warden J. T.*, Paramagnetic Intermediates in Photosynthesis, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **27**, 378—385, 1976.
- Dilley R. A., Giaquinta R. T.*, H^+ Ion Transport and Energy Transduction in Chloroplasts, *Curr. Top. Membrane Transp.*, **7**, 49—107, 1975.
- Dutton P. L., Wilson D. F.*, Redox Potentiometry in Mitochondrial and Photosynthetic Bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta*, **346**, 165—212, 1974.
- Hatch M. D., Slack C. R.*, Photosynthetic CO_2 -Fixation Pathways, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 141—162, 1970.
- Heber U.*, Metabolic Exchange between Chloroplasts and Cytoplasm, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **25**, 393—421, 1974.
- Heldt H. W.*, Transfer of Substrates across the Chloroplast Envelope, *Horiz. Biochem. Biophys.*, **2**, 199—229, 1976.
- Hill R.*, The Biochemist's Green Mansions: The Photosynthetic Electron Transport Chain in Plants, *Essays Biochem.*, **1**, 121—152, 1965.
- Jagendorf A., Uribe E.*, Photophosphorylation and the Chemiosmotic Hypothesis, *Brookhaven Symp. Biol.*, **19**, 215—245, 1967.
- Ke B.*, The Primary Electron Acceptor of Photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, **301**, 1—33, 1973.
- Kelly G. J., Latzko E., Gibbs M.*, Regulatory Aspects of Photosynthetic Carbon Metabolism, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **27**, 181—206, 1976.
- Kirk J. T. O.*, Chloroplast Structure and Biogenesis, *Annu. Rev. Biochem.*, **40**, 161—196, 1971.
- Kok B., Cheniae G. M.*, Kinetics and Intermediates of the Oxygen Evolution Step in Photosynthesis, *Curr. Top. Bioenerg.*, **1**, 2—48, 1966.
- Mauzerall D.*, Chlorophyll and Evolution, *Phil. Trans. R. Soc. Lon.*, **B273**, 287—294, 1976.
- Park R. B., Sane P. V.*, Distribution of Function and Structure in Chloroplast Lamellae, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **22**, 395—430, 1971.
- Parson W. W., Cogdell R. J.*, The Primary Photochemical Reaction of Bacterial Photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **416**, 105—149, 1975.
- Preiss J., Kosuge T.*, Regulation of Enzyme Activity in Photosynthetic Systems, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 433—466, 1970.

- Radmer R., Kok B.*, Energy Capture in Photosynthesis: Photosystem II, *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 409—433, 1975.
- Schwartz M.*, Relation of Ion Transport to Phosphorylation, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **22**, 469—485, 1971.
- Thornber J. P.*, Chlorophyll-proteins: Light Harvesting and Reaction Center Components of Plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **26**, 127—158, 1975.
- Trebst A.*, Energy Conservation in Photosynthetic Electron Transport of Chloroplasts, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **25**, 423—458, 1974.
- Turner J. F., Turner D. H.*, The Regulation of Carbohydrate Metabolism, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **26**, 159—186, 1975.
- Van Niel C. B.*, The Bacterial Photosyntheses and Their Importance for the General Problem of Photosynthesis, *Adv. Enzymol.*, **1**, 263—328, 1941.
- Walker D. A., Crofts A. R.*, Photosynthesis, *Annu. Rev. Biochem.*, **39**, 389—428, 1970.
- Zelitch I.*, Pathways of Carbon Fixation in Green Plants, *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 123—145, 1975.
-

Глава 17

МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ. I

Переваривание и всасывание.

Липиды крови и липопротеиды.

Липиды тела. Окисление жирных кислот.

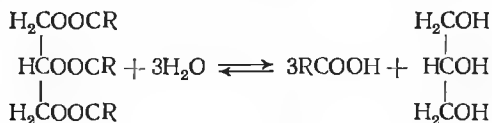
Синтез жирных кислот. Взаимопревращения жирных кислот. Синтез триацилглицеринов.

Регуляция метаболизма липидов. Метаболизм этанола

Для оптимального роста и нормального функционирования организму млекопитающего требуются небольшие количества липидорастворимых витаминов (гл. 51) и некоторых ненасыщенных жирных кислот. Эти потребности организма делают липиды незаменимыми компонентами пищи; кроме того, липиды представляют собой наиболее концентрированный источник энергии для организма, давая более чем в два раза больше калорий на один грамм, чем углеводы и белки (разд. 11.1.1), и обеспечивая от одной трети до половины общего количества калорий средней диеты населения США.

17.1. Переваривание липидов пищи

Основная масса липидов пищи представлена триацилглицеринами. В желудочно-кишечном тракте часть их гидролизуется *липазами* до жирных кислот и глицерина.



Неполный гидролиз дает смесь моно- и диацилглицеринов наряду с конечным продуктом реакции.

17.1.1. Переваривание липидов в желудке

Оптимальной средой для действия желудочной липазы является среда, близкая к нейтральной; липаза практически неактивна при низких значениях pH желудка, поэтому ее значение не яс-

но, хотя некоторое количество жирных кислот освобождается в желудке. Существует предположение, что желудочная липаза играет важную роль у детей, так как рН сока желудка в детском возрасте значительно выше, и, кроме того, липиды молока находятся в высокоэмульгированном состоянии, благоприятствующем атаке водорастворимого фермента.

17.1.2. Переваривание липидов в кишечнике

Основное место переваривания липидов — тонкий кишечник. В двенадцатиперстной кишке пища подвергается воздействию *желчи и сока поджелудочной железы*.

17.1.2.1. Роль желчи

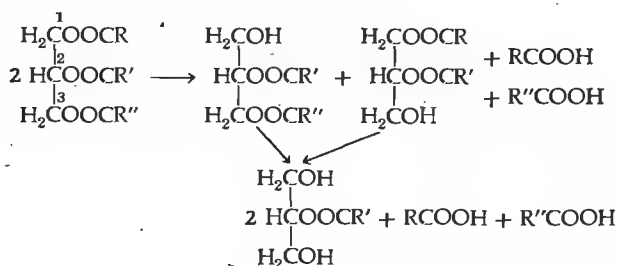
Функция желчи — стимулировать эмульгирование и солюбилизацию липидов путем воздействия желчных солей (разд 3.4.5.4). Секрция желчи рассмотрена в гл. 34. Так как липиды в основном нерастворимы в воде, то они подвергаются действию гидролитических ферментов только на границе раздела между липидными каплями и водной фазой. Скорость реакции частично определяется площадью этой границы раздела, и поэтому чем выше степень эмульгирования и чем меньше отдельные липидные капли, тем больше величина общей доступной поверхности. Желчь и сок поджелудочной железы обладают слабощелочной реакцией и нейтрализуют кислый химус желудка. В нейтральной среде просвета кишечника желчные кислоты, в основном таурохолевая и гликохолевая, являются амфифильными (гл. 3) и служат в качестве эмульгирующих агентов (разд. 3.5). В присутствии этих поверхностно-активных веществ (ПАВ) и под действием перистальтики происходит все более тонкое распределение липидов пищи в водной фазе, что способствует липолизу. В эмульгировании участвуют также и белок.

Эмульгирование солями желчных кислот, по-видимому, не абсолютно необходимо для переваривания, так как липидный остаток, обнаруживаемый в кале в тех случаях, когда желчь полностью отсутствует в желудочно-кишечном тракте, в значительной степени гидролизован и состоит главным образом из солей жирных кислот. Непереносимость пищевых липидов при закупорке желчных путей заставляет полагать, что у этих лиц плохо перевариваются липиды. Однако известно, что мыла и моноацилглицерины, которые образуются при частичном гидролизе жиров, также действуют как ПАВ и таким образом дополняют функцию желчных солей.

17.1.2.2. Панкреатическая липаза

Секреция сока поджелудочной железы, так же как и секреция желчи, стимулируется гормонами после поступления химуса из желудка в двенадцатиперстную кишку. В соке поджелудочной железы присутствует предшественник *липазы*, активирующийся в просвете кишки путем образования комплекса с *колипазой* ($M 10\,000$) в молярном соотношении 2 : 1. Это способствует сдвигу оптимума pH от 9 до 6 и предотвращению денатурации фермента. На скорость катализируемого липазой гидролиза не оказывают существенного влияния ни степень ненасыщенности жирной кислоты (от отсутствия двойных связей до двух двойных связей на молекулу), ни длина цепи (от C_{12} до C_{18}). Ca^{2+} ускоряет гидролиз главным образом потому, что он образует нерастворимые мыла с освобождающимися жирными кислотами. Это предотвращает ингибирующее действие свободных жирных кислот на фермент и также ограничивает ресинтез ацилглицеринов, практически сдвигая реакцию в направлении гидролиза.

Гидролиз ацилглицеринов происходит в положении 1 или 3 и приводит к образованию 1,2-диацилглицеринов, которые затем гидролизуются до 2-моноацилглицеринов. Только часть моноацилглицеринов гидролизуются до глицерина:



R, R' и R'' — цепи различных жирных кислот.

В соке поджелудочной железы присутствуют также *эстеразы*. Они катализируют преимущественно гидролиз эфиров жирных кислот с короткой цепью, например трибутирина и других эфиров жирных кислот, особенно эфиров холестерина. Эти эстеразы активны только в присутствии солей желчных кислот.

В поджелудочной железе синтезируется *профосфолипаза A₂*, которая активируется трипсином с образованием *фосфолипазы A₂*; для действия этого фермента необходимы соли желчных кислот и Ca^{2+} . Фермент образует лизофосфатидилхолин из фосфатидилхолина (разд. 3.3.2.1). Фосфолипаза A₂ присутствует и в слизистой оболочке кишечника. Лизофосфатидилхолин является хорошим ПАВ и способствует эмульгированию липидов пищи. Благо-

даря присутствию в желчи некоторого количества фосфатидилхолина — предшественника лизофосфатидилхолина — обеспечивается дополнительный источник ПАВ.

17.2. Всасывание липидов в кишечнике

После приема жирной пищи тонкий кишечник содержит анноны жирных кислот и смесь моно-, ди- и триацилглицеринов, хорошо эмульгированных солями желчных кислот и мылами. Основная часть этой смеси всасывается через стенку тонкого кишечника. Глицерин водорастворим и вместе с жирными кислотами с короткой цепью уходит из кишечника через портальное кровообращение. Жирные кислоты с длинной цепью уходят через кишечную лимфатическую систему, где они обнаруживаются в виде триацилглицеринов. Всасывание из кишечника липидов и их проникновение в лимфу было показано в 1891 г. Мунком с использованием фистулы, соединявшей содержимое лимфатического сосуда большого с внешней средой на поверхности кожи бедра. Мунк добавлял в пищу своего пациента различные жиры и обнаружил, что более 60% потребляемого жира могло быть обычно обнаружено в отделяемом через фистулу материале. Вскоре после приема жирной пищи лимфа, прозрачная при голодании, становилась молочно-белой вследствие появления мелких жировых капелек, которые впоследствии были названы хиломикронами (см. ниже). Преобладающими липидами лимфы были триацилглицерины, и даже когда жирные кислоты потреблялись в виде сложных эфиров с другими спиртами, в лимфе они были обнаружены главным образом в виде эфиров глицерина.

Эти и другие наблюдения привели к мысли, что сложные эфиры полностью гидролизуются в тонком кишечнике, а жирные кислоты проходят через барьер слизистой кишечника и поступают в терминальные лимфатические сосуды, будучи реэтерифицированными глицерином.

Указанное представление о процессе всасывания липидов включало два независимых положения: 1) общий гидролиз предшествует всасыванию; 2) продукты переваривания липидов поступают в кровотоки исключительно через лимфатическую систему. Ни один из этих положений не оказался полностью правильным. Исследования с мечеными триацилглицеринами показали, что приблизительно 40% принимаемых с пищей триацилглицеринов гидролизуются до глицерина и жирных кислот, от 3 до 10% всасывается в виде триацилглицеринов, а остальные частично гидролизуются в основном до 2-моноацилглицеринов.

Жирные кислоты с длиной цепи менее чем 10 углеродных атомов, всасываются преимущественно в неэтерифицированной фор-

ме через систему портального кровообращения, после чего поступают непосредственно в печень. Это очень важно для питания детей, так как молоко богато жирными кислотами с более короткой цепью.

Жирные кислоты с длинной цепью (более чем с 14 атомами углерода) независимо от того, поступают они с пищей в виде триацилглицеринов или свободных жирных кислот, появляются в хилусе главным образом в виде регенерированных триацилглицеринов в составе *хиломикронов*. Эти частицы со средним диаметром приблизительно 1 мкм представляют собой липопroteиды, содержащие в основном липиды и небольшое количество белка. Таким образом, при всасывании происходит *ресинтез* триацилглицеринов частично из 2-моноацилглицеринов. Хиломикроны поступают в кровь главным образом у места впадения левой подключичной вены в яремную вену через грудной проток и менее крупные лимфатические сосуды.

Вообще липиды, жидкие при температуре тела, хорошо перевариваются и всасываются. Липиды, точка плавления которых значительно выше температуры тела, плохо перевариваются и всасываются, и всасывание осуществляется легко только в смеси с более низкоплавящимися липидами.

17.2.1. Факторы, влияющие на всасывание липидов

В настоящее время изучены не все факторы, ответственные за распределение жирных кислот с различной длиной цепи между лимфой и кровью. Однако известно, что различия способов всасывания липидов зависят от их растворимости в воде, взаимодействий с белками и характера мицеллообразования, а также от специфичности ферментов ресинтеза триацилглицеринов (см. ниже). Вместе с тем известны некоторые факторы, влияющие на прохождение липидов через слизистую оболочку кишечника; возможно, наиболее важными в этом случае являются ПАВ просвета кишечника.

В случае полного отсутствия желчи в кишечном тракте в результате выраженной дисфункции печени, экстрагепатической закупорки желчных протоков вне печени или фистулы желчевыводящих протоков всасывание липидов заметно ухудшается. В результате в *безжелчном* кале повышается содержание липидов, особенно солей жирных кислот, главным образом нерастворимых кальциевых солей. У таких больных фекалии имеют характерный глинистый цвет, что связано с большим количеством солей жирных кислот и отсутствием желчного пигмента. Другие жирорастворимые вещества также слабо всасываются в отсутствие желчи. Наиболее ярким примером этого является недостаточность витамина К, которая может быть быстро устранена пероральным приемом

солей желчных кислот или парентеральным введением витамина К (гл. 51). Это следует учитывать при хирургических операциях больных желчно-каменной болезнью, так как витамин К требуется для обеспечения нормальной скорости свертывания крови (гл. 29).

Роль солей желчных кислот во всасывании жирных кислот связана с их поверхностно-активными свойствами и способностью к мицеллообразованию с моноацилглицеринами, мылами и небольшими количествами других жирорастворимых веществ. Эти мицеллы проходят через водный слой, имеющийся на поверхности слизистой оболочки кишечника.

Желчные соли не попадают в лимфатическую систему, несмотря на то, что они проходят через барьер слизистой оболочки в связанном с липидами состоянии. По венам кишечника они поступают в порталный кровоток, откуда извлекаются печенью и затем снова вводятся с желчью в двенадцатиперстную кишку. При этом круговороте теряется относительно мало желчных кислот, небольшое количество оказывается в периферической крови и около 200 мг в сутки выделяется с калом.

Другой фактор, влияющий на всасывание липидов из просвета кишечника, — метаболическая активность слизистой оболочки кишечника как таковой. В клетках слизистой оболочки кишечника присутствуют ферментные системы, которые могут превращать свободные жирные кислоты и моно- и диацилглицерины в триацилглицерины. Одна из этих систем подобна такой в печени и будет описана ниже (разд. 17.9).

Некоторая избирательность проявляется слизистой оболочкой кишечника в отношении всасывания стероидов, особенно стероидов растительного происхождения. Из числа наиболее важных стероидов, поступающих с пищей, только холестерин легко проникает через стенку кишечника и всасывается через млечные протоки. Витамин D и некоторые стероидные гормоны, будучи введенными перорально, легко всасываются из кишечника.

17.2.2. Липиды кала; стеаторрея

Присутствие липидов в кале частично объясняется недостаточным полным всасыванием липидов пищи и частично экскрецией липидов в содержимое кишечника. Липиды, особенно стероиды, присутствуют в желчи, в составе которой они попадают в кишечник. Кроме этого, происходит и прямая экскреция липидов через кишечный барьер. Липиды, экскретируемые либо с желчью, либо через слизистую оболочку кишечника, могут появляться в кале наряду с продуктами, образуемыми из этих липидов кишечными бактериями. Этот последний фактор важен для метаболизма стероидов и будет рассмотрен ниже (разд. 18.3.1).

Избыток липидов в кале, *стеаторрея*, может быть обусловлен отсутствием желчи, отсутствием сока поджелудочной железы или дефектом слизистой оболочки кишечника. *Стеаторрея*, связанная с недостаточностью желчи, как указывалось выше, обычно проявляется наличием в кале избыточного количества переваренных, но не всосавшихся липидов главным образом в форме мыл. Дифференциальную диагностику облегчает характерное отсутствие желчных пигментов в кале. Такая *стеаторрея* может быть результатом закупорки желчных путей, вызванной камнем или опухолью, фистулой желчных протоков или выраженными диффузными поражениями печени.

Следует отличать хроническое заболевание поджелудочной железы от некоторых заболеваний кишечного тракта, таких, как упорные поносы у детей или спру у взрослых. В этих условиях эмульгирование и переваривание жира в основном протекают нормально, так как поступление желчи и сока поджелудочной железы не нарушено. *Стеаторрея*, часто резко выраженная в этом случае, связана с недостатком активного процесса всасывания в слизистой оболочке кишечника. Липиды кала находятся главным образом в форме мыл. В этих условиях не только липиды, но и ряд других продуктов питания не всасываются с нормальной скоростью.

17.3. Липиды крови и липопротеиды

В связи с тем что большинство липидов практически нерастворимо в водной среде, транспорт этих веществ в плазме крови осуществляется не так, как транспорт водорастворимых молекул подобного размера. Практически все липиды транспортируются в ассоциации со специфическими липопротеидами. Эти комплексы образуются в слизистой оболочке кишечника и в печени. Практически в плазме крови нет липидов, которые не были бы связаны с белком.

Обычно после приема пищи плазма крови человека содержит около 500 мг общих липидов на 100 мл. Приблизительно четверть этих липидов составляют триацилглицерины, около 220 ± 20 мг — холестерин, приблизительно две трети которого этерифицировано жирными кислотами, и одна треть присутствует в виде свободного стерина. Фосфолипиды составляют около 160 мг/100 мл; концентрация фосфатидилхолина выше, чем фосфатидилэтаноламина. Свободные жирные кислоты присутствуют в малых количествах (табл. 29.1).

После завершения процесса всасывания лимфа брыжеечного и грудного протоков представляет собой прозрачную, водянистую

жидкость. Вскоре после поступления жирной пищи в двенадцатиперстную кишку лимфатические каналы, ранее видимые с трудом, растягиваются за счет наполнения молочно-белой жидкостью (хилусом), богатой триацилглицеринами. Большая часть жира присутствует в хилусе в виде хиломикронов. Выделение этого хилуса в венозную кровь приводит к быстрому повышению содержания липидов в плазме, иногда достаточному для появления молочно-белой опалесценции. Повышение количества липидов в крови, которое временно наступает вслед за приемом жиров, называется *абсорбтивной липемией*.

Ряд фракций липопротеидов может быть разделен повторным центрифугированием плазмы при высоких скоростях после соответствующего увеличения плотности плазмы добавлением солей или $^2\text{H}_2\text{O}$. Эти липопротеиды могут быть охарактеризованы по константам флотации S_f , которые аналогичны константам седиментации обычных белков (разд. 5.1.1), и по плотностям, при которых они выделяются. Некоторые свойства липопротеидных фракций приведены в табл. 17.1 (см. также табл. 29.1). Фракции с самой низкой плотностью (и высоким значением S_f) наиболее богаты триацилглицеринами и бедны белком.

Электронная микроскопия выделенных липопротеидных фракций показала, что они представляют собой сферические частицы, диаметр которых уменьшается с увеличением плотности. Липопротеиды включают ядро из гидрофобных липидов — триацилглицеринов, эфиров холестерина и др., в то время как наружная часть, находящаяся в контакте с плазмой крови, содержит такие амфифильные липиды, как фосфатидилхолин. Гидрофобные области белковых компонентов локализуются в основном во внутренней части, а гидрофильные — преимущественно на поверхности частиц. Таким образом, эти белки плазмы играют основную роль в транспорте водонерастворимых липидов. Даже в хиломикронах присутствует небольшое количество белка для стабилизации капелек.

Для некоторых полипептидных цепей апопротеидов различных липопротеидных фракций изучена аминокислотная последовательность: апо-CI (57 остатков), апо-CIII (79 остатков), апо-AI (245 остатков) и апо-AII (две идентичные цепи из 77 остатков, соединенные дисульфидной связью). Приведенные в табл. 17.1 данные о том, что многие из этих апопротеидов связаны более чем с одной фракцией липопротеидов, указывают на то, что классификация этих фракций до некоторой степени условна и что фракции подвержены изменениям состава (а следовательно, плотности и S_f) в процессе транспорта липидов к тканям. Полупериод удаления липидов из крови человека — около 1 ч. Аномалии метаболизма липопротеидов рассмотрены в гл. 18.

17.3.1. Основные представления о метаболизме триацилглицеринов

Триаилглицерины транспортируются в форме хиломикронов и поступают главным образом в печень и жировую ткань, но также и в сердце, легкие и другие органы. На поверхности клеточных мембран этих тканей *липопротеидлипаза* гидролизует триаилглицерины, при этом жирные кислоты и глицерин всасываются; они могут метаболизироваться непосредственно или, как в жировой ткани, ресинтезироваться в триаилглицерины для резервирования. Из всех тканей организма млекопитающего только мозг не утилизирует жирные кислоты для окисления, но при некоторых условиях он может метаболизировать β -оксисаляную кислоту — продукт метаболизма жирных кислот (разд. 17.10.3).

17.3.1.1. Липопотеидлипаза

Внутривенная инъекция гепарина (гл. 38) заметно ускоряет исчезновение мутности липемической плазмы *in vivo*. Это обусловлено активацией *липопротеидлипазы* крови. Этот фермент происходит как из печени, так и из жировой ткани. В плазме он обнаруживается только при липемии. Активность фермента жировой ткани повышается в присутствии апо-СII или фосфатидилхолина. Более того, необходимо присутствие сывороточного альбумина как акцептора жирных кислот, освобождаемых при действии липазы. Таким образом, альбумин играет существенную роль в транспорте жирных кислот, которые присутствуют в плазме в концентрации от 8 до 30 мг/100 мл (табл. 29.1). Эти кислоты имеют высокую метаболическую скорость обмена.

17.3.1.2. Липемия

При редком аутомном рецессивном генетическом нарушении — наследственной гиперхиломикронемии или гиперлипопротеидемии типа I, имеется недостаточность липопотеидлипазы жировой ткани, которая может быть количественно оценена путем введения гепарина. У таких больных наблюдается выраженная *хиломикронемия* и содержание триаилглицеринов обычно превышает 2 г/100 мл плазмы. Другие типы гиперлипопротеидемий классифицируются на основе повышенной концентрации одного или более классов липопотеидов плазмы. Все эти редкие генетические нарушения (типы II—V) сопровождаются повышенным уровнем холестерина плазмы и обычно высоким уровнем триаилглицеринов.

Липемия часто наблюдается при ацидозе в случаях диабета и при гликогенозах (нарушениях образования тканевых резервов

гликогена). У некоторых больных с нефротическим синдромом нарушена нормальная утилизация липопротеидов с S_f от 0 до 20. У больных с инфарктом миокарда повышен уровень липопротеидов наиболее низкой плотности, особенно класса с S_f от 12 до 20. У таких больных могут также наблюдаться гиперхолестеринемия и повышенный уровень триацилглицеринов. Однако и при нормальных концентрациях липопротеидов отмечаются заметные изменения в их относительном содержании, например в соотношении α - и β -липопротеидов без значительных изменений общего холестерина плазмы. Следовательно, выяснение распределения или относительных концентраций липопротеидных фракций, или липидов этих фракций, является более информативным в плане диагностики, чем определение общей концентрации какого-либо одного специфического липида в плазме.

У мужчин в возрасте между 20 и 40 годами наблюдается более высокое содержание в плазме липопротеидов низкой плотности и более низкое содержание липопротеидов высокой плотности, чем у женщин той же возрастной группы. В пожилом возрасте у мужчин и женщин отмечаются более высокие концентрации липопротеидов низкой плотности, чем у молодых мужчин и женщин. Влияние этих соотношений на возникновение атеросклероза будет обсуждено в гл. 49.

17.4. Липиды тела

Приблизительно 10% массы тела млекопитающего составляют липиды, главным образом триацилглицерины. Липиды распределены между всеми органами, главным образом в некоторых депонированных соединительной и в жировой тканях, в которой большая часть цитоплазмы клеток заполнена липидными каплями.

17.4.1. Функции липидов тела

Липиды тела являются резервуаром потенциальной химической энергии. В организме здорового млекопитающего количество мобилизуемых липидов больше, чем мобилизуемых углеводов. Эти липиды хранятся в относительно безводном состоянии в противоположность углеводам, которые в значительной степени гидратированы. Депонированные липиды служат в качестве резервуара энергии, доступного в периоды голодания для осуществления многочисленных эндергонических процессов, необходимых для поддержания жизни.

Значительное количество липидов млекопитающих локализовано подкожно, где они служат в качестве изоляционного материала

ла, предохраняющего от избыточной потери тепла в окружающую среду. Эта функция особенно ярко проявляется у морских млекопитающих, среда обитания которых имеет намного более низкую температуру, чем тело этих животных, и вместе с тем намного лучше, чем воздух, проводит тепло. У китов толстый и сплошной слой подкожной жировой ткани, китовый жир, снижает потерю тепла в окружающую среду. Подкожные липидные депо также защищают от механических травм. Ярким примером этого является депо высокоспециализированных липидов (спермацет, разд. 3.4.2), которое позволяет кашалоту наносить головой удары большой силы.

Отсутствие резервных липидов во время внутриутробной жизни плода млекопитающего представляет интерес с точки зрения понимания функций липидных депо в жизни взрослого организма. Плод получает необходимое питание через плаценту из материнского кровообращения и получает его постоянно в противоположность взрослому организму, который питается время от времени. Плод не нуждается в резервуарах энергии (резервные липиды) на длительный срок, так как он живет в терморегулируемом окружении, хорошо защищен амниотической жидкостью и тканями материнского организма от механических ударов. Лишь незадолго до рождения плод создает собственное депо липидов.

17.4.2. Характеристика депонированных липидов

Резервные липиды состоят главным образом из триацилглицеринов. У различных видов наблюдаются значительные вариации в составе липидов, но в пределах каждого вида состав в большей степени постоянен. Более 99% липидов жировой ткани человека составляют триацилглицерины; по составу различные жировые депо человека подобны друг другу независимо от их анатомической локализации. В целом резервные липиды более богаты насыщенными жирными кислотами, чем липиды печени (разд. 3.3). Липиды в местах депонирования находятся в жидком состоянии; липиды, которые откладываются подкожно, по-видимому, насыщены настолько, насколько это совместимо с их жидким состоянием. Чем более насыщены липиды, тем выше энергетический выход при их окислении. Таким образом, у млекопитающих откладывается под кожей такой тип липидов, который наиболее богат химической потенциальной энергией и в то же время находится еще в жидком состоянии при температуре тела.

Хотя состав жировых депо у каждого вида животных довольно постоянен, резкие изменения температуры или диеты могут вызвать некоторые его вариации. Влияние диеты на состав липидных депо позволяет судить о происхождении жирных кислот депо: из жирных кислот диеты или из углеводов (см. ниже). Продолжительное питание человека пищей, богатой кукурузным маслом (когда кукурузное масло обеспечивает 40% калорий), приводит после 20 недель диетического

питания к значительному повышению содержания ненасыщенных жирных кислот в жировой ткани. Через 160 недель состав жира напоминает в большей степени кукурузное масло, чем нормальную жировую ткань. Зависимость состава резервных липидов от липидов пищи может проявиться и раньше в том случае, если животное голодало до истощения большей части липидных депо и затем получало рацион, богатый липидами, отличающимися по физическим свойствам от его природных липидов. Так, если свиньи или крысы получают рацион, богатый полиненасыщенным маслом, подобным маслу земляного ореха, депо будут содержать липиды, напоминающие по высокой степени ненасыщенности масло земляного ореха. Восполнение липидных депо путем скармливания лишенной незаменимых липидов пищи с высоким содержанием углеводов приводит к образованию депо с очень низким содержанием ненасыщенных жирных кислот.

Некоторые млекопитающие обладают жировыми депо, содержащими высокие концентрации гликогена и коричневого пигмента. Такая бурая жировая ткань, как, например, в межлопаточных депо у крыс, активно метаболизирует тем же способом, что и обычная белая жировая ткань, и таким же образом участвует в теплопродукции. Наиболее яркая особенность бурых жировых клеток — присутствие большого количества липидных вакуолей, окруженных митохондриями. Цитохромы митохондрий, возможно, ответственны за красновато-коричневую окраску бурой жировой ткани.

17.4.3. Аспекты метаболизма липидов организма

Если животное питается избыточно, количество липидов в его теле увеличивается, и наоборот, во время периодов длительного голодания количество липидов тела уменьшается. Эти изменения состоят в первую очередь в отложении триацилглицеринов в жировой ткани. Можно, однако, отрегулировать потребление пищи так, что количество липидов в организме будет оставаться постоянным в течение длительного периода времени. Действительно, у большинства взрослых животных существует такая регуляция аппетита, благодаря которой содержание липидов тела быстро не изменяется.

Резервные липиды непрерывно мобилизуются, при этом непрерывно депонируются новые липиды, и постоянство количества резервных липидов является результатом относительно точного соответствия скоростей этих двух процессов. В стационарном состоянии период полупревращения резервного липида мышей составляет около 5 сут, крыс — около 8 сут. Это означает, что у крыс почти 10% жирных кислот в резервных липидах заменяется ежедневно новыми жирными кислотами. В печени крыс жирные кислоты имеют период полупревращения около 2 сут, в мозге — от 10 до 15 сут.

17.5. Окисление жирных кислот

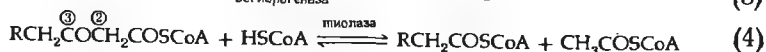
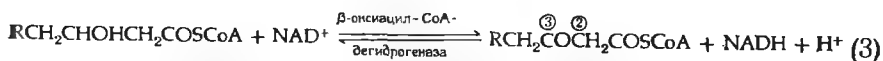
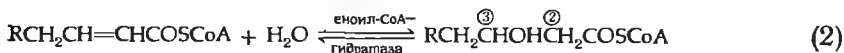
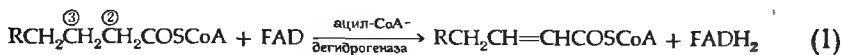
Триаилглицерины попадают в клетку только в ограниченном количестве. Они подвергаются гидролизу под действием липопро-теидлипазы в плазме крови или активируемой гормонами липопро-теидлипазы в жировой ткани (разд. 17.10.2), что приводит к освобождению жирных кислот, связывающихся с сывороточным аль-

бумином, и глицерина. Глицерин участвует в гликогенезе и входит в гликолитический путь посредством образования глицерол-3-фосфата при действии АТФ и глицеролкиназы.

В общих чертах окисление жирных кислот протекает следующим образом. Жирные кислоты входят в клетку, после чего они должны быть активированы путем образования СоА-производных. Эти производные жирных кислот, однако, не способны проникать в митохондрию, единственное место в клетке, где осуществляется окисление СоА-производных жирных кислот. Переносчиком ацильных групп из цитоплазмы в матрикс митохондрии служит карнитин; в матриксе снова образуются СоА-производные жирных кислот и происходит освобождение карнитина. СоА-производные жирных кислот окисляются путем ряда последовательных реакций, которые приводят к укорачиванию цепи жирной кислоты на два углеродных атома за один раз (β -окисление). В этих реакциях все промежуточные продукты являются производными СоА.

Исходным соединением в процессе укорачивания цепи является тиоэфир кофермента А и жирной кислоты, и процесс включает четыре последовательные реакции: 1) дегидрирование, катализируемое флавопротеидом с образованием 2,3-*транс*-ненасыщенных производных, 2) гидратацию двойной связи с образованием 3-оксисоединений, 3) дегидрирование при участии NAD с образованием 3-кетопроизводных и 4) реакцию β -кетоацил-СоА с другой молекулой СоА с образованием ацетил-СоА и жирнокислотного производного СоА, укороченного на два углеродных атома. Последовательное повторение этого ряда четырех реакций приводит к полному распаду жирных кислот с четным числом атомов углерода до ацетил-СоА; в ходе этого же процесса происходит последовательное превращение жирных кислот с нечетным числом атомов углерода до соответствующего числа молекул ацетил-СоА и одной молекулы пропионил-СоА.

Эти четыре реакции приведены ниже; COSCoA указывает, что ацильные производные связаны с тиольной группой СоА.

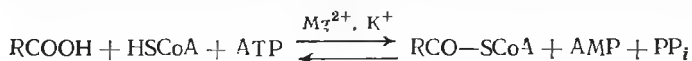


Рассмотрим теперь подробнее каждую из этих реакций.

17.5.1. Реакции активации

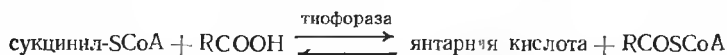
Метаболизм жирных кислот начинается с образования соответствующих CoA-производных; это происходит двумя способами.

При первом способе ацил-CoA—синтетаза катализирует образование CoA-производных жирных кислот согласно реакции



Известно несколько таких ферментов; их называют в соответствии с названием жирной кислоты, скорость превращения которой максимальна, например *ацетил-CoA—синтетаза* (катализирует превращение жирных кислот C_2 и C_3), *октаноил-CoA—синтетаза* (жирные кислоты от C_4 до C_{12}) и *додеканоил-CoA—синтетаза* (жирные кислоты от C_{10} до C_{18}). Механизм таких реакций уже обсуждался (разд. 12.2.1). Эти ацил-CoA—синтетазы присутствуют в эндоплазматической сети и в *наружной* митохондриальной мембране. В митохондриальном матриксе имеется ацил-CoA—синтетаза, которая вместо ATP использует GTP. Этот фермент активирует жирные кислоты с длинной цепью, и продуктами реакции являются GDP и P_i .

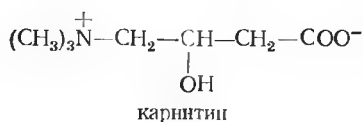
Вторым механизмом синтеза CoA-производных жирных кислот с короткой цепью является реакция переноса, катализируемая *тиофоразами*:



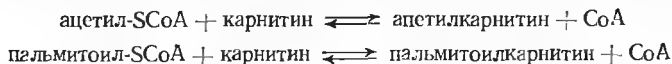
В животных тканях, таких, как печень, сердце и почки, активация жирных кислот происходит главным образом посредством реакций, катализируемых синтетазами, в то время как у некоторых микроорганизмов преобладают реакции, катализируемые тиюфоразами. Тиюфоразная реакция наиболее характерна для экстрагепатических тканей животных, где происходит процесс генерации ацетואцетил-CoA (разд. 17.10.2).

17.5.2. Роль карнитина в транспорте ацильных остатков жирных кислот

Карнитин (1-3-окси-4-триметиламмонийбутират) служит переносчиком ацильных групп внутрь митохондрий и наружу (карнитин-новый челнок).



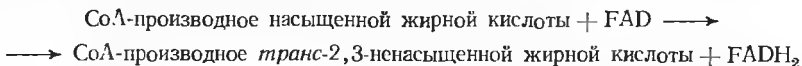
В этом процессе участвуют две *ацилтрансферазы*; одна из них катализирует ацилирование карнитина жирными кислотами с короткой цепью и называется *карнитин-ацетилтрансфераза*. Другой фермент катализирует ацилирование карнитина жирными кислотами с длинной цепью; он назван *карнитин-пальмитоилтрансфераза*.



Приведенные выше реакции обратимы; $K_{\text{равн}}$ близка к 1, что указывает на высокую энергию О-ацильной связи карнитина. Ферменты находятся как в цитоплазме, так и в наружной мембране митохондрий и на внутренней поверхности внутренней митохондриальной мембраны. Таким образом, производные карнитина служат в качестве переносчиков ацильных групп внутрь митохондрий, где ацильные группы переносятся на CoA, образуя ацил-CoA, которые окисляются в митохондриях. В результате достигается разделение цитоплазматического и митохондриального пулов CoA.

17.5.3. Ацил-CoA-дегидрогеназы

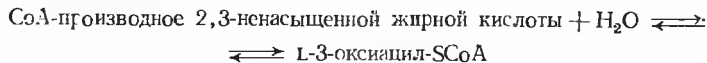
Все те ферменты, которые катализируют образование CoA-производных 2,3-ненасыщенных жирных кислот [реакция (1), разд. 17.5], содержат FAD. Три таких фермента выделены из печени свиньи и названы по наиболее быстро утилизируемым субстратам, а именно *бутирил-CoA-дегидрогеназа*, *октаноил-CoA-дегидрогеназа* и *гексадеканойл-CoA-дегидрогеназа*. Реакции, катализируемые каждым из этих ферментов, таковы:



Как указывалось ранее (разд. 13.2), атомы водорода переходят от флавиновой части этих ацилдегидрогеназ к электронпереносящему флавопротенду (ЭПФ), который в свою очередь направляет электроны к цитохрому *b*.

17.5.4. Еноил-CoA-гидратазы (кротоназы)

Эти ферменты обратимо катализируют гидратацию CoA-производных *транс*-ненасыщенных жирных кислот [реакция (2), разд. 17.5] согласно реакции

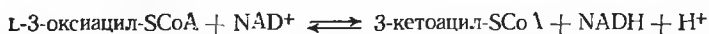


Один фермент наиболее активен с кротоноил-CoA (и поэтому назван *кротоназой*). Фермент не требует кофактора; его активность

снижается при увеличении длины цепи субстрата. Фермент тканей быка (M 168 000) является гексамером. Второй тип еноил-СоА-гидратазы был выделен из сердца свиньи; этот фермент действует преимущественно на производные с длинной и средней цепями.

17.5.5. β -Оксиацил-СоА-дегидрогеназа

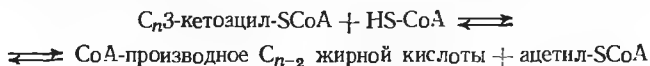
Реакция (3) (разд. 17.5) требует NAD.



Субстраты с различной длиной цепи атакуются одним и тем же ферментом.

17.5.6. Тиолазы

Реакция, катализируемая тиолазами [реакция (4), разд. 17.5], включает тиолитическое расщепление с помощью СоА с образованием ацетил-СоА

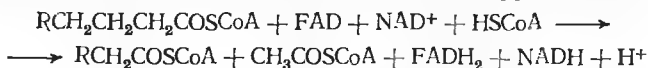


Некоторые из известных тиолаз проявляют специфичность в отношении длины цепи. Они представляют собой тиоловые ферменты, и промежуточным продуктом двустадийной реакции является ацил-S-фермент



Хотя реакция в целом обратима, равновесие смещено в значительной степени в сторону расщепления. Константа равновесия для образования 2 молей ацетил-СоА из ацетоацетил-СоА равна $6 \cdot 10^4$.

Суммарно укорочение цепи СоА-производного жирной кислоты на два углеродных атома может быть описано уравнением



Ацетил-СоА, генерируемый при деградации жирных кислот, смешивается с ацетил-СоА, образующимся при других реакциях, включая окислительное декарбоксилирование пирувата (разд. 12.2.1), так же как и реакции расщепления многих аминокислот (гл. 23). Многочисленные пути участия ацетил-СоА в метаболизме, в том числе его участие в цикле трикарбоновых кислот и синтезе жирных кислот и стерина и т. д., обсуждаются в соответствующих разделах.

Наряду с CoA-производными продуктами кагаболлизма жирных кислот являются восстановленные коферменты NADH и FADH₂, которые окисляются по реакциям, приведенным в гл. 12. Энергия, которая высвобождается в результате расщепления жирных кислот, становится доступной для организма благодаря дальнейшим превращениям NADH, FADH₂ и ацетил-CoA. Четыре атома водорода, удаляемые из ацильной цепи при двух дегидрогеназных реакциях, окисляются в электронпереносящей цепи. Окисление FADH₂ и NADH приводит к образованию АТР; показано, что в ходе приведенных выше реакций расщепления при образовании ацетил-CoA на 1 моль O₂ генерируется 5 молей богатого энергией фосфата, а на каждый моль образующегося ацетил-CoA потребляется 1 моль O₂. Окисление ацетил-CoA через цикл трикарбоновых кислот дает дополнительно 12 молей АТР на моль окисляемого ацетил-CoA (разд. 12.5). Общий выход энергии при окислении 1 моля пальмитоил-CoA вычислен в табл. 17.2. Однако для образо-

Таблица 17.2

Общий выход высокоэнергетического фосфата при окислении жирных кислот

Реакция	Выход ~Р, моль
Пальмитоил-CoA + 7O ₂ → 8 ацетил	35
8 Ацетил + 16O ₂ → 16H ₂ O + 16CO ₂ (8 оборотов трикарбонового цикла дают 12 молей ~Р на каждый оборот)	96
Всего	131

вания пальмитоил-CoA из пальмитата расходуются 2 экв. АТР. Если принять, что ΔG составляет 12 000 кал/моль АТР при физиологических условиях, то это соответствует запасанию около 1550 ккал химической энергии в форме АТР (129 молей АТР, образующихся при полном окислении 1 моля пальмитата). Такой энергетический выход составляет около 60% от 2400 ккал, высвобождающихся при окислении 1 моля (256 г) пальмитиновой кислоты до CO₂ и H₂O в калориметрической бомбе. Соотношение цикла реакций окисления жирных кислот и цикла трикарбоновых кислот изображено на рис. 17.1.

Все насыщенные жирные кислоты с четным числом углеродных атомов окисляются таким же образом. Часто встречающиеся моноеновые жирные кислоты, олеиновая и пальмитоолеиновая, окисляются так же, но образуют Δ^{3-цис}-еноил-CoA-производные после удаления нескольких единиц ацетил-CoA. Δ^{3-цис}:Δ^{2-транс}-еноил-

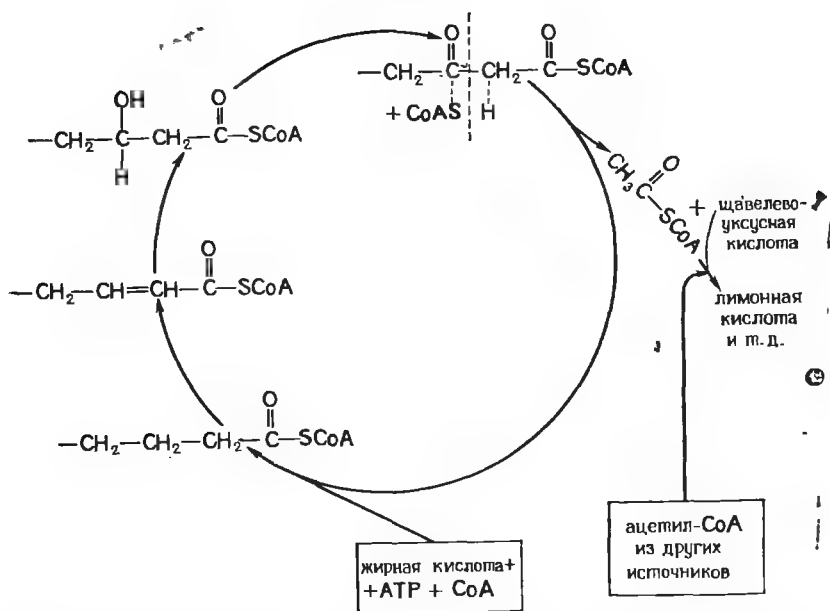
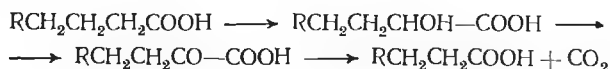


Рис. 17.1. Взаимоотношение между распадом жирных кислот и циклом лимонной кислоты.

СоА-изомеразы превращают эти производные в изомеры, которые могут быть в дальнейшем окислены путем последовательного удаления ацетил-СоА.

17.5.7. α -Окисление жирных кислот

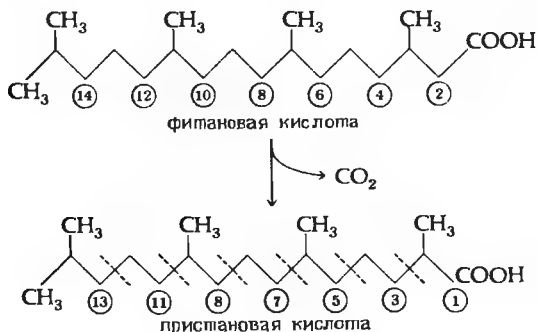
Хотя для жирных кислот наиболее характерно β -окисление, встречаются также два других типа окисления: α - и ω -окисления. Окисление жирных кислот с длинной цепью до 2-окисикислот и затем до жирных кислот с числом атомов углерода на один меньше, чем в исходном субстрате, было показано в микросомах мозга и других тканей, а также в растениях. 2-Окисикислоты с длинной цепью являются компонентами липидов мозга (гл. 37). Эти жирные окисикислоты могут быть превращены в 2-кетокислоты, затем они подвергаются окислительному декарбоксилированию, ведущему к образованию длинноцепочечных жирных кислот с нечетным числом атомов углерода



Начальная стадия, гидроксилирование во втором положении, катализируется митохондриальной *монооксигеназой*, которая требует присутствия O_2 , Mg^{2+} , NADPH и термостабильного кофактора. Превращение α -оксикислоты в CO_2 и следующую незамещенную кислоту с меньшим на один числом атомов углерода происходит в эндоплазматической сети и требует O_2 , Fe^{2+} и аскорбата.

Большое количество *фитановой кислоты* — 3,7,11,15-тетраметилгексадекановой кислоты — накапливается в тканях и сыворотке крови у лиц с болезнью *Рефсума* — наследственным нарушением, влияющим на нервную систему и связанным с неспособностью осуществлять α -окисление этой кислоты. У таких больных до 20% жирных кислот сыворотки и 50% жирных кислот печени может быть представлено фитановой кислотой, в то время как в нормальной сыворотке она составляет менее 1 мкг/мл. Фитановая кислота является продуктом окисления фитола (разд. 3.4.4). Фитановая кислота присутствует в животном жире, коровьем молоке и пищевых продуктах, получаемых из молока. Фитол имеет преимущественно растительное происхождение, так как он входит в состав молекулы хлорофилла. Обнаружено, что некоторые симптомы болезни Рефсума могут быть облегчены диетой с низким содержанием животных жиров и молочных продуктов.

Присутствие метильной группы в третьем положении фитановой кислоты блокирует β -окисление. У здоровых людей окисление *фитанат- α -оксидазой* дает CO_2 и *пристановую кислоту* — 2,6,10,14-тетраметилпентадекановую кислоту, которая затем легко подвергается β -окислению после превращения в CoA-производные



Пунктирной линией показаны обычные места расщепления при последовательном β -окислении, в ходе которого образуется сначала по 3 экв. пропионил-CoA и ацетил-CoA, а в конце — один эквивалент изобутирил-CoA, который превращается в сукцинил-CoA (рис. 23.4).

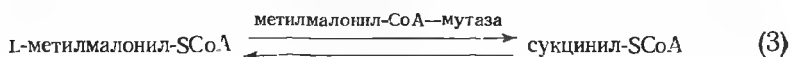
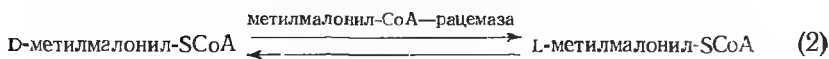
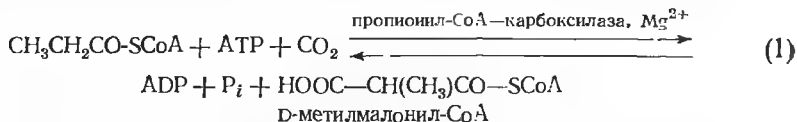
17.5.8. ω -Окисление жирных кислот

Жирные кислоты со средней длиной цепи и в меньшей степени длинноцепочечные жирные кислоты могут первоначально подвергаться ω -окислению до жирных ω -оксикислот, которые затем превращаются в α , ω -дикарбоновые кислоты. Эту серию реакций наблюдали с ферментами микросом печени. Первоначальная стадия катализируется монооксигеназой, которая требует присутствия NADPH, O_2 и цитохрома P_{450} . Образующаяся дикарбоновая кислота может быть укорочена с любого конца молекулы путем последовательности реакций β -окисления, описанной выше.

Образование α,ω -дикарбоновых кислот характерно также для некоторых микроорганизмов и происходит путем расщепления у двойной связи. Именно таким образом при расщеплении олеиновой кислоты у двойной связи в положении 9, 10 образуется азелаиновая кислота (девять атомов углерода), которая затем подвергается β -окислению, давая пимелиновую кислоту, предшественник биотина (гл. 50).

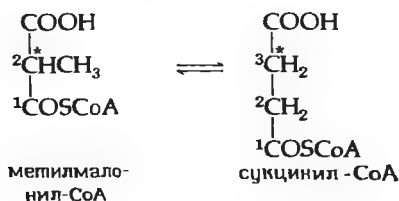
17.5.9. Метаболизм пропионата

Окисление жирной кислоты с четным числом углеродных атомов приводит к полному расщеплению до ацетил-CoA. При окислении жирных кислот с нечетным числом атомов углерода также образуются последовательно молекулы ацетил-CoA и 1 экв. пропионил-CoA. Пропионовая кислота или пропионил-CoA образуются и при окислении алифатических аминокислот с разветвленной цепью (рис. 23.4). Образование пропионил-CoA из пропионовой кислоты катализируется *ацетил-CoA-синтетазой* (разд. 17.5.1). В митохондриях животных тканей основной путь метаболизма пропионил-CoA осуществляется по механизму, частично обратному механизму образования пропионовой кислоты некоторыми бактериями (разд. 14.9.3 и далее). Этот путь суммирован в следующих трех уравнениях; итогом процесса является образование из пропионил-CoA сукцинил-CoA — промежуточного продукта цикла трикарбоновых кислот.



Пропионил-CoA-карбоксилаза, выделенная в кристаллическом состоянии из сердца свиньи, содержит 1 моль биотина на 175 000 г

белка с M 700 000. Биотин присоединен амидной связью к ϵ -аминогруппам лизиновых остатков, как и в других биотинсодержащих ферментах (гл. 50). Карбоксилазная реакция включает образование комплекса фермент—биотин— CO_2 , подобного описанному для ацетил- CoA —карбоксилазы (разд. 17.6.1). Метилмалонил- CoA -рацемеза делает подвижным водородный атом в α -положении, вслед за чем происходит захват протона из среды; таким образом катализируется взаимопревращение D - и L -метилмалонил- CoA . Образование сукцинил- SCoA из L -метилмалонил- SCoA совершается с участием метилмалонил- CoA —мутазы, утилизирующей кобамидный кофермент (производное витамина B_{12} , гл. 50). Когда $2\text{-}^{14}\text{C}$ -метилмалонил- CoA подвергали превращению с помощью мутазы, метка (отмечена ниже звездочкой) была найдена в положении 3 сукцинил- CoA , что указывает скорее на межмолекулярный перенос всей тиоэфирной группы, $-\text{COSCoA}$, чем на миграцию карбоксильного углерода.

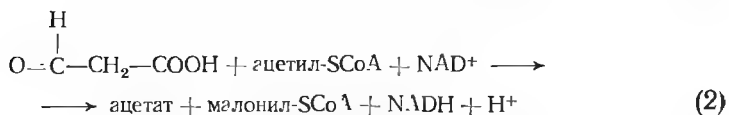
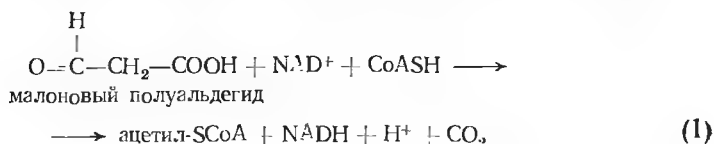


При равновесии предпочтительным является образование сукцинил- CoA в соотношении с метилмалонил- CoA 20:1. У лиц с недостаточностью витамина B_{12} как пропионат, так и метилмалонат в необычно больших количествах выводятся с мочой.

Два наследственных типа метилмалоновой ацидемии (и ацидурии) у маленьких детей сопровождаются замедлением роста и умственной отсталостью. При одном типе белок мутазы отсутствует или является аномальным, так как добавление кобамидного кофермента к экстрактам печени не восстанавливает активность мутазы. При другом типе потребление больших доз витамина B_{12} облегчает ацидемию и ацидурию, а добавление кобамидного кофермента к экстрактам печени восстанавливает активность мутазы; вероятно, в этом случае ограничена способность превращения витамина в кофермент.

Другой тип наследственного нарушения метаболизма пропионата обусловлен недостаточностью пропионил- CoA —карбоксилазы, что приводит к повышению содержания пропионовой кислоты в крови и моче. Было найдено, что у таких лиц, так же как и у больных метилмалоновой ацидезией, часть пропионата все же окисляется до CO_2 даже при отсутствии регистрируемой активно-

сти пропионил-СоА—карбоксилазы. Это наблюдение привело к обнаружению второго пути окисления пропионата. 3-Оксипропионат образуется при последовательном действии ацил-СоА-дегидрогеназы и еноил-СоА—гидратазы, как описано для окисления жирных кислот (разд. 17.5.1 и 17.5.2). Превращение 3-оксипропионата в малоновый полуальдегид катализируется NAD-зависимой *3-оксипропионатдегидрогеназой*. Малоновый полуальдегид превращается в ацетил-СоА или прямым окислительным декарбоксилированием [реакция (1)], или путем окисления до малонил-СоА [реакция (2)], сопровождаемого декарбоксилированием [реакция (3)].



Изучение вышеуказанных нарушений метаболизма пропионата позволило обнаружить еще один путь метаболизма пропионата, а именно образование 2-метилцитрата, который присутствует в моче как главный продукт метаболизма пропионата, независимо от того, обусловлена ли пропионовая ацидемия недостаточностью пропионил-СоА—карбоксилазы или, вторично, метилмалоновой ацидемией. При конденсации пропионил-СоА и оксалоацетата может образовываться метилцитрат аналогично конденсации ацетил-СоА и оксалоацетата с образованием цитрата (разд. 12.2.2).

17.6. Синтез жирных кислот

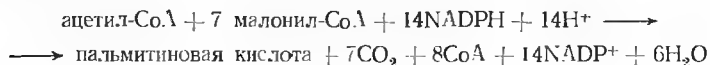
Организм млекопитающего может синтезировать большую часть жирных кислот, требуемых для роста и поддержания жизни. Насыщенные жирные кислоты, так же как и обычные мононенасыщенные жирные кислоты, образуются быстро и в большом количестве из ацетил-СоА. Таким образом, любое вещество, способное давать ацетил-СоА, является потенциальным источником углеродных атомов в реакциях синтеза жирных кислот, основном процессе *липогенеза*. Источником ацетил-СоА может служить избыточная глюкоза пищи, принимаемая сверх непосредственных энергетических потребностей, а также сохраняемые в резерве полисахариды и аминокислоты, не требующиеся для других функций. Организм

животного может накапливать жир при содержании на безжировом рационе, богатом углеводами.

Биосинтез насыщенных жирных кислот происходит во всех живых организмах, в том числе у млекопитающих, главным образом в жировой ткани, молочной железе и печени. В противоположность окислению жирных кислот, которое является исключительно митохондриальным, основным местом липогенеза является цитозоль. Далее, синтез жирных кислот требует присутствия NADPH, бикарбоната и Mn^{2+} — веществ, не требующихся при окислении жирных кислот. Ниже будет рассмотрен в первую очередь синтез в цитоплазме посредством главного метаболического пути липогенеза, а затем два других типа синтеза — один, связанный с удлинением жирных кислот со средней длиной цепи в митохондриях, и другой — с удлинением CoA-производных полиненасыщенных жирных кислот с участием ферментов, локализованных в мембранах эндоплазматической сети.

17.6.1. Цитоплазматический механизм синтеза пальмитиновой кислоты

Пальмитат-синтетаза катализирует общий процесс



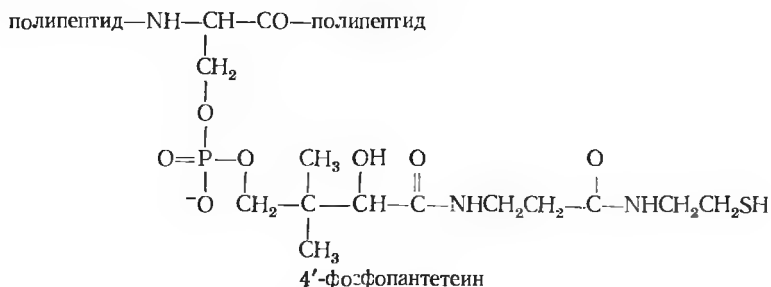
Для иницирования процесса требуется одна молекула ацетил-CoA; его углеродные атомы превращаются в конце концов в терминальную CH_3CH_2 -группу (15-й и 16-й атомы углерода) пальмитиновой кислоты. Ацетильная группа переносится к сульфгидрильной группе 4-фосфопантетеина, который соединен сложноэфирной связью с гидроксидной группой серина на белке, называемом *ацил-переносящим белком* (АПБ). Все последующие стадии происходят с ацильными группами, связанными с фосфопантетином. Другие семь ацетильных единиц доставляются в форме малонил-CoA, образуемого из бикарбоната и ацетил-CoA с помощью ацетил-CoA — карбоксилазы. Когда каждая единица из двух углеродных атомов добавляется из малонил-CoA, третий углеродный атом малоновой кислоты — неэтерифицированная карбоксильная группа — высвобождается в виде CO_2 . Окончательным продуктом является пальмитиновая кислота — источник всех других насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот млекопитающих и всех жирных кислот микроорганизмов.

Большая часть информации, касающейся процесса синтеза пальмитиновой кислоты, была получена первоначально при изучении ферментов *E. coli*, где каждый фермент существует в виде отдельного белка и мог быть изолирован в высокоочищенном состо-

янии. В противоположность этому отдельные каталитические единицы *пальмитат—синтетазы* дрожжей и печени птиц или млекопитающих, по-видимому, локализованы в одной полипептидной цепи. Синтетазы млекопитающих и птиц ($M \approx 500\,000$) состоят из двух отдельных, по-видимому, идентичных субъединиц ($M \approx 250\,000$), каждая из которых содержит 4'-фосфопантетеиновую простетическую группу, как в АПБ. Полный синтез пальмитата из ацетил-СоА, малонил-СоА и NADPH включает в принципе одни и те же наборы реакций как в случае *E. coli*, так и в случае ферментов печени, но в синтезах млекопитающих и птиц каждая реакция катализируется на двух субъединицах этого одного многофункционального фермента.

17.6.1.1. Ацилпереносящий белок (АПБ)

Белок *E. coli* (M 8847) содержит 4'-фосфопантетеин, присоединенный к сериновому остатку 36 фосфодиэфирной связью. Все ацильные промежуточные продукты связываются в форме тиоловых эфиров таким же образом, как с СоА, который также содержит 4'-фосфопантетеин в качестве ацилсвязывающего участка (разд. 12.2.1).



Образование АПБ происходит путем переноса 4'-фосфопантетеина от СоА к апо-АПБ, катализируемого *холо*[ацилпереносящий белок]-синтазой.

Ацилпереносящая активность АПБ млекопитающих, по-видимому, присуща определенным участкам отдельных полипептидных цепей, которые обладают также и другими активностями, требуемыми для процесса превращения ацетил-СоА, малонил-СоА и NADPH в пальмитат.

17.6.1.2. Образование малонил-СоА

Малонил-СоА является первым продуктом, синтезируемым в последовательности реакций, приводящих к образованию длинно-

ми (ср. разд. 14.5 и 17.5.7). Экзергоническая природа расщепления комплекса также объясняет потребность в АТФ для его образования из бикарбоната и биотин-фермента.

17.6.1.3. Регулирование активности ацетил-СоА—карбоксилазы

Активность ацетил-СоА—карбоксилазы печени и жировой ткани млекопитающих зависит от присутствия цитрата и изоцитрата. В неактивной форме фермент состоит из протомеров (M от 400 000 до 500 000), причем каждый протомер состоит из четырех субъединиц. Активация цитратом или изоцитратом сопровождается полимеризацией фермента в нитчатую форму (M $5 \div 10 \cdot 10^6$). Образование карбоксибиотина индуцирует конформационное изменение и при отсутствии цитрата или изоцитрата приводит к деполимеризации до протомеров.

Поскольку малонил-СоА, очевидно, не имеет другого пути метаболизма помимо его роли в образовании пальмитата, регуляция активности карбоксилазы является эффективным путем контроля синтеза жирных кислот без влияния на другие метаболические пути.

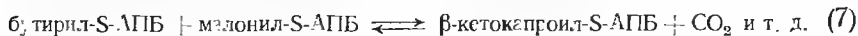
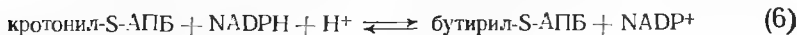
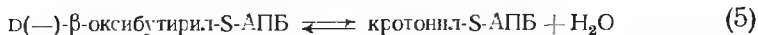
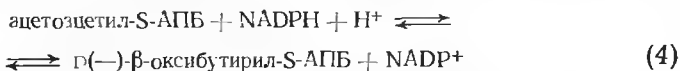
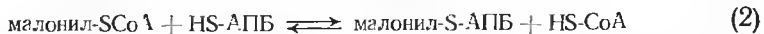
Следовательно, продукты метаболизма углеводов — цитрат и изоцитрат, которые принимают участие в цикле трикарбоновых кислот, являются факторами регуляции синтеза жирных кислот у млекопитающих; указанные факторы активируют ацетил-СоА—карбоксилазу, которая катализирует лимитирующую стадию процесса. Следует отметить, что эти эффекторы влияют скорее на величину $V_{\text{макс}}$, чем на K_m . Существенно, что избыток цитрата в митохондриях свободно проходит в цитоплазму. Другие регуляторные факторы метаболизма липидов рассматриваются далее (разд. 17.10).

Роль цитрата как необходимого положительного аллостерического эффектора ацетил-СоА—карбоксилазы проявляется в случае действия гормона глюкагона (гл. 46) на синтез жирных кислот. Этот гормон — путем повышения [сАМР] — стимулирует выход свободных жирных кислот из печени (гл. 46), снижая таким образом потенциальное количество ацетил-СоА, которое могло бы принять участие в синтезе цитрата в этом органе. В результате концентрация цитрата в цитоплазме клеток печени может снижаться на 90%, что приводит к прекращению синтеза жирных кислот.

Активность ацетил-СоА—карбоксилазы повышена в печени, слизистой оболочке кишечника и в жировой ткани животных, получавших богатую углеводами безжировую диету, т. е. в условиях, как известно, способствующих липогенезу; напротив, активность этого фермента подавляется у голодающих животных или у животных, получающих диету с высоким содержанием жира.

17.6.1.4. Превращение малонил-СоА в пальмитиновую кислоту

Как было уже сказано в этом разделе, в полном синтезе пальмитиновой кислоты используются семь молекул малонил-СоА и одна молекула ацетил-СоА, и в каждой из стадий процесса синтеза участвует АПБ. В приведенной ниже суммарной последовательности реакций АПБ обозначается как HS-АПБ, чтобы указать его активные центры ацилирования. Процесс представлен на рис. 17.2.



Эта серия реакций затем продолжается путем повторения циклов, аналогичных реакциям (4) — (7), с удлинением цепи на два углеродных атома в каждом цикле, как показано на рис. 17.2. Реакции (5) и (6) аналогичны реакциям, с которыми мы встречались ранее при рассмотрении окисления жирных кислот (разд. 17.5.1 и далее). В животных тканях процесс оканчивается освобождением пальмитиновой кислоты в результате гидролитического действия *пальмитоил-АПБ-деацилазы* (стадия 7, рис. 17.2).

Приведенные выше реакции катализируют следующие ферменты у *E. coli*: реакция (1) — *ацетилтрансацилаза*; реакция (2) — *малонилтрансацилаза*; реакция (3) — *β -кетоацил-АПБ-синтаза*; реакция (4) — *β -кетоацил-АПБ-редуктаза*; реакция (5) — *β -оксиацил-АПБ-гидратаза* и реакция (6) — *эноил-АПБ-редуктаза*. Ферменты для реакций (1) — (3) и (5) являются ферментами, содержащими сульфгидрильные группы; фермент для реакции (4) не содержит сульфгидрильной группы. Ферменты для реакций (3) и (5) специфичны для производных АПБ. Таким образом, ацил-АПБ, а не ацил-СоА непосредственно включается в синтез длинноцепочечных жирных кислот с помощью пальмитат-синтетазы: метильная группа исходного ацетил-АПБ остается концевой в растущей цепи.

Для включения каждой из семи двухуглеродных единиц, полученных из малонил-СоА, в многофункциональной системе синтетазы животных требуется семь циклов. Фермент принимает только ацетил-СоА или малонил-СоА; производные жирных кислот с промежуточной длиной цепи не подвергаются воздействию этой си-

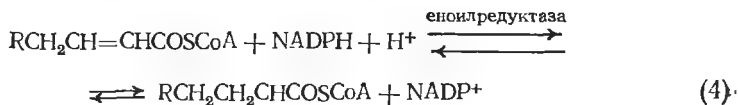
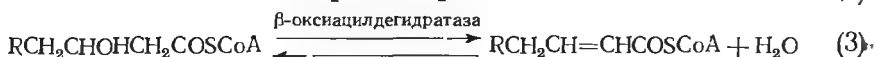
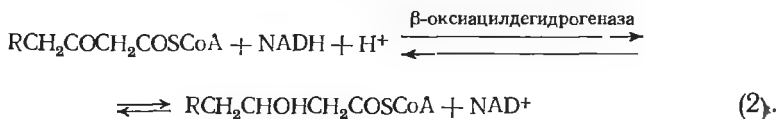
активны, а NADPH активирует фермент, способствуя ассоциации субъединиц. Эта многофункциональная молекула фермента обеспечивает высокоэффективный общий механизм последовательного синтетического процесса. При этом гарантируется образование именно пальмитата, поскольку в процесс могут включаться только ацетил и малонил, и *деацилаза* способна специфически отщеплять только пальмитат.

Некоторые различия между митохондриальной системой окисления жирных кислот и цитоплазматической синтетической системой отмечены в табл. 17.3.

17.6.2. Удлинение молекул жирных кислот в митохондриях

Митохондрии содержат комплекс ферментов, который катализирует удлинение ранее синтезированных жирных кислот путем последовательного добавления единиц ацетил-СоА. Фиксации CO_2 не требуется, и продуктами являются незаменимые C_{18} -, C_{20} -, C_{22} - и C_{24} -жирные кислоты.

В действительности в мозге мышей имеются три отдельных конденсирующих фермента, которые катализируют превращение C_{16} в C_{18} , C_{18} в C_{20} и C_{20} в C_{22} и C_{24} . Постулирована следующая последовательность удлинения цепи из четырех стадий:



Первые три стадии обратны последним трем реакциям окисления жирных кислот (разд. 17.5 и далее), хотя они, возможно, не катализируются теми же ферментами. Однако реакция (4) катализируется NADPH-зависимой еноилредуктазой вместо специфической требующей FAD ацил-СоА-дегидрогеназы, которая катализирует необратимое превращение жирных кислот в ненасыщенные (разд. 17.5). Синтезирующий комплекс активен также с ненасыщенными кислотами; это будет показано ниже.

17.6.3. Удлинение молекул жирных кислот в микросомах

Удлинение жирных кислот в микросомах осуществляется не через ацетил-СоА, а через малонил-СоА и происходит с использованием как насыщенных, так и ненасыщенных ацил-СоА. Жирная кислота сначала превращается в ацил-СоА и затем реагирует с малонил-СоА, что сопровождается восстановлением с помощью NADPH-зависимого фермента. Промежуточные продукты при этом процессе те же, что и при действии пальмитат-синтетазы, но они не связываются с АПБ. Удлинение происходит наиболее быстро с производными жирных кислот от C_{10} до C_{16} и с ненасыщенными соединениями C_{18} -ряда.

17.7. Источники восстановленных нуклеотидов

Осуществление липогенеза требует доступных источников NADPH для цитоплазматического и митохондриального путей синтеза малонил-СоА, а также NADH и NADPH для митохондриального и микросомального путей удлинения жирных кислот. В цитоплазме существует несколько источников восстановленных нуклеотидов.

1. Существенным источником цитоплазматического NADPH являются реакции дегидрирования в ходе фосфоглюконатного окислительного пути. Таким образом синтез жирных кислот связывается с окислительным путем метаболизма глюкозы, причем существенно, что образующийся в цитоплазме NADPH лишь с трудом может окисляться в митохондриях.

2. Цитоплазматический NADH образуется в триозофосфат-дегидрогеназной реакции.

3. Третьим источником являются реакции цикла лимонной кислоты. Цитрат, образованный в митохондриях и транспортируемый во внемитохондриальные отсеки клетки, расщепляется *цитрат-лиазой* (разд. 14.5.1.3). Образующаяся щавелевоуксусная кислота затем превращается в малат, который в реакции с малик-ферментом (разд. 14.5.1) дает пируват, NADPH и CO_2 . Эта последовательность реакций сопряжена с использованием NADH, образующегося при гликолизе, для синтеза цитоплазматического NADPH. Более подробно это рассматривается далее (разд. 17.10.1).

Все три возможных способа обеспечения цитоплазматического липогенеза восстановленными нуклеотидами еще раз свидетельствуют о связи синтеза жирных кислот с метаболизмом углеводов. Кроме того, поскольку окисление ацетил-СоА через цикл лимонной кислоты [реакция (3)] зависит от источника оксалоацетата, а последний может быть образован при карбоксилировании пирувата, полученного при гликолизе, очевидно, что окисление жирных кислот также зависит от метаболизма углеводов.

Таблица 17.4

Некоторые пути синтеза жирных кислот^a

Система	Фракция клетки	Субстраты	Кофакторы	Продукт
Образование de novo	Цитоплазма	Ацетил-CoA + малонил-CoA	NADPH, АПБ	C ₁₆ :0
Удлинение	Митохондрия	Ацил-CoA длинноцепочечной жирной кислоты (насыщенной или ненасыщенной) + ацетил-CoA	NADPH, NADH	C _n + 2 : <i>y</i> -Ацил-CoA (<i>y</i> = 0-6)
	Микросомы	Ацил-CoA длинноцепочечной жирной кислоты (C ₁₀ :0 — C ₁₆ :0) + малонил-CoA	NADPH	C _n + 2 : 0'-Ацил-CoA
		Ненасыщенный ацил-CoA (C ₁₈ :3 > C ₁₈ :2 > C ₁₈ :1) + малонил-CoA	NADPH	Ненасыщенный C _n +2-Ацил-CoA
Конденсация	Растворимый комплекс	C _n -Ацил-CoA (n = 8, 10, 16, 24)	NADH, АТР, Мп ²⁺	C _{2n} -Ацил-CoA

^a По работе Olson J. A., Annu. Rev. Biochem., 35, 559, 1966.

Для удлинения жирных кислот в митохондриях восстановленные пиридиннуклеотиды поставляются при функционировании цикла лимонной кислоты, причем из NADH как непосредственного источника в результате перегидрирования образуется NADPH.

В табл. 17.4 приведены некоторые характерные особенности синтеза жирных кислот.

17.7.1. Синтез жирных оксикислот

Образование α -, β - и γ -оксикислот как промежуточных при окислении жирных кислот было рассмотрено ранее (разд. 17.5.1 и далее). Жирные α -оксикислоты, например цереброновая кислота (разд. 3.4.1.2), являются компонентами липидов мозга и синтезируются гидроксилированием длинноцепочечных жирных кислот, как описано ранее (разд. 17.5.5). Другие жирные оксикислоты, в которых гидроксидная группа локализована ближе к центру цепи, образуются гидратацией моноеновых кислот. Экстракты из *Pseudomonas* катализируют гидратацию олеиновой кислоты до 10-окстеариновой. Для синтеза рицинолеил-CoA из олеил-CoA, катализируемого растворимыми ферментами из семян клещевины, требуются NADPH и O_2 . Образовавшаяся рицинолевая кислота, 12-оксисолеиновая, может быть удлинена растворимой ферментной системой (см. выше) с участием ацетил-CoA.

17.7.2. Другие аспекты синтеза жирных кислот

Наряду с описанными выше путями синтеза жирных кислот имеются данные о специфических путях синтеза у бактерий и растений. Например, у некоторых бактерий высшие длинноцепочечные жирные кислоты образуются при конденсации CoA-производных жирных кислот различной длины цепи. Так, октаноил-CoA непосредственно встраивается в C_{16} - и C_{24} -жирные кислоты с помощью растворимых ферментов из *Mycobacterium tuberculosis*. У бактерий, растений и насекомых обнаружены жирные кислоты, содержащие циклические структуры. Циклопропан-синтаза *Clostridium butyricum* катализирует перенос метильной группы от S-адеинозилметионина (разд. 21.4.2.10) к двойной связи β - или γ -мононенасыщенной жирной кислоты фосфатидилэтаноламина или фосфатидилглицерина; присоединившийся углеродный атом включается в циклопропановое кольцо. Экстракты из *Pseudomonas* катализируют гидратацию ненасыщенных жирных кислот до соответствующих оксикислот.

Мембраны микроорганизмов существенно различаются по составу жирных кислот. У *E. coli* насыщенные и мононенасыщенные жирные кислоты присутствуют приблизительно в равных количествах, в то время как у *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus* метилразветвленных жирных кислот в два раза больше, чем насыщенных. Разветвленные жирные кислоты *B. subtilis* образуются из продуктов деградации аминокислот с разветвленной цепью валина, изолейцина и лейцина, т. е. соответственно из изобутирил-CoA, 2-метилбутирил-CoA и изовалерил-CoA (разд. 23.2.10). Эти CoA-производные реагируют с АПБ, и затем подвергаются удлинению цепи с образованием *изо*-кислот с четным (14 и 16) числом атомов углерода, *антеизо*-кислот с нечетным числом углеродных атомов (15 и 17) и *изо*-кислот с нечетным количеством атомов углерода (главным образом 15). Показано, что АПБ из *B. subtilis* проявляет предпочтительную специфичность к CoA-производным с разветвленной короткой цепью в качестве предшественников жирных кислот, а не к ацетил-CoA. Многие бактериальные мембраны содержат свободные жирные кислоты, в то время как в мембранах эукариот они полностью отсутствуют.

17.8. Взаимопревращения жирных кислот

Организм получает жирные кислоты из пищи и путем липогенеза из ацетил-СоА, образующегося из углеводов и некоторых аминокислот. Состав смеси жирных кислот пищи существенно варьирует по степени ненасыщенности и длине цепи. Липогенез у высших животных включает только образование пальмитата, из которого образуются другие насыщенные и мононенасыщенные кислоты.

Из смеси имеющихся жирных кислот в печени животного образуется свойственный данному виду набор жирных кислот; однако на характере синтезируемых жирных кислот сказывается также и диета. Процессы утилизации жирных кислот пищи включают укорочение и удлинение углеродного скелета, так же как и введение двойной связи.

17.8.1. Укорочение и удлинение углеродного скелета

Если давать крысам радиоактивно меченную пальмитиновую C_{16} -кислоту, метка в наибольшей концентрации обнаруживается в пальмитиновой кислоте во всех липидах организма. Однако значительное количество изотопа обнаруживается также в стеариновой C_{18} - и миристиновой C_{14} -кислотах организма. Подобным же образом, скормливание меченой стеариновой кислоты приводит к появлению метки в пальмитиновой кислоте липидов организма. Эти данные четко указывают на то, что удлинение или укорочение углеродного скелета насыщенных жирных кислот происходит путем присоединения или потери двух атомов углерода за один раз, как можно ожидать из реакций деградации и удлинения, описанных ранее.

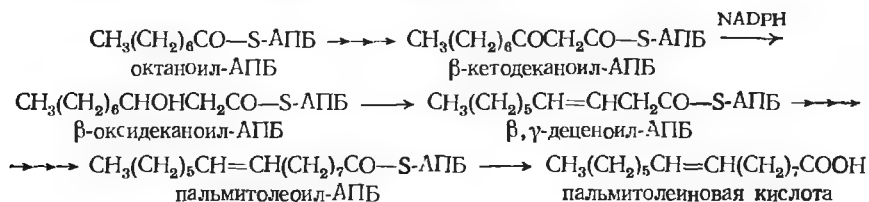
17.8.2. Образование мононенасыщенных кислот

При скормливании радиоактивно меченных пальмитиновой или стеариновой кислот радиоактивность обнаруживается как в насыщенных, так и в ненасыщенных жирных кислотах. Кормление насыщенной C_{18} -кислотой приводит к накоплению изотопа в олеиновой кислоте (C_{18} с одной двойной связью), а кормление насыщенной C_{16} кислотой дает пальмитолеиновую кислоту (C_{16} с одной двойной связью). Значит, организм млекопитающего способен к десатурации этих насыщенных жирных кислот с образованием соответствующих 9,10-ненасыщенных производных.

Введение двойной связи может происходить аэробным и анаэробным путями. В аэробной системе микросом животных тканей комплекс *стеароил-СоА-десатуразы* требует NADH и участок микросомальной системы переноса электронов (разд. 13.6.6).

В аэробной системе некоторых микроорганизмов участвуют O_2 и NADPH, так же как и ферредоксин, специфическая NADPH-редуктаза (флавиновый фермент) и десатураза, специфичная к стероил-АПБ. У растений десатурация производных АПБ идет по аэробному механизму, но у высших растений нет ацил-СоА-АПБ-ацилтрансферазы, специфичной к длинноцепочечным СоА-производным, вследствие чего они не могут десатурировать пальмитоил- или стеароил-СоА.

Изучен также анаэробный путь образования мононенасыщенных жирных кислот микроорганизмов. Последовательность реакций включает образование АПБ-производного β -оксикислоты со средней длиной цепи, затем реакции дегидратации и удлинения, которые катализируются комплексом синтетазы жирных кислот; компонентом этого комплекса является дегидраза, называемая β -оксидеканоилтиозфирдегидразой. Дегидраза из *E. coli* (M 28 000) катализирует или *транс*- α, β -, или *цис*- β, γ -дегидратацию, причем первая является предпочтительной. Фермент проявляет высокую степень специфичности к длине цепи, причем является наиболее активным по отношению к C_{10} β -окситиозфиду. Ниже представлено образование пальмитолеиновой кислоты из октаноил-АПБ у *E. coli*:



У *E. coli* имеется несколько различных ацил-АПБ-дегидраз со специфичностью, определяемой длиной цепи.

17.8.3. Образование и превращения полиненасыщенных кислот

Ткани животных содержат множество полиненасыщенных жирных кислот. Среди них одна серия может синтезироваться в организме животного *de novo*. Это жирные кислоты, у которых двойная связь лежит между седьмым атомом углерода (считая от концевой метильной группы) и карбоксильной группой. Как видно из рис. 17.3, такие жирные кислоты могут быть образованы из олеиновой кислоты путем чередования реакций десатурации и удлинения цепи. Однако полиненасыщенные жирные кислоты, в которых одна или более двойных связей расположены в пределах семи терминальных углеродных атомов, не могут быть синтезированы *de novo*. Такие полиненасыщенные жирные кислоты являются незаменимыми в пищевом рационе; после введения меченой стеариновой кислоты метка не обнаруживается в тканевых линолевой или линоленовой кислотах (C_{18} с двумя и тремя двойными связями соответственно).

Таким образом, у млекопитающих существуют четыре группы полиненасыщенных жирных кислот; для образования двух из них необходимы линолевая и линоленовая кислоты пищи, а две другие

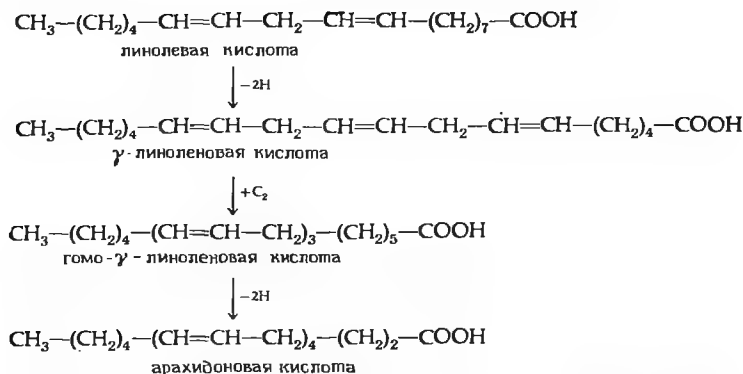


Рис. 17.4. Образование арахидоновой кислоты из линолевой кислоты.

синтезируются из мононенасыщенных кислот, олеиновой и пальмитолеиновой, которые в свою очередь образуются из соответствующих насыщенных кислот (см. выше). Эти четыре группы могут быть классифицированы в зависимости от расстояния между терминальной метильной группой и ближайшей двойной связью.

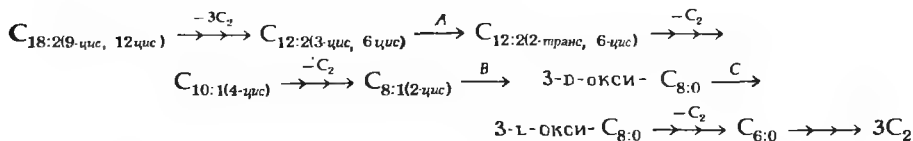
Семейство линолевой кислоты:	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-$
Семейство линоленовой кислоты:	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$
Семейство пальмитоолеиновой кислоты:	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-$
Семейство олеиновой кислоты:	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-$

Все другие полиненасыщенные кислоты могут быть образованы из этих четырех предшественников путем последовательностей реакций, при которых цепь поочередно удлиняется и дегидрируется. Удлинение может происходить при участии микросомального комплекса, который использует малонил-СоА. Дегидрирование происходит также в микросомальной фракции по механизму, подобному, но не идентичному механизму, связанному с образованием мононенасыщенных жирных кислот. В животных тканях сопряженные двойные связи не образуются. Образование арахидоновой кислоты более подробно представлено на рис. 17.4. Рис. 17.3 демонстрирует различные метаболические пути, объясняющие присутствие разнообразных полиненасыщенных жирных кислот в животных тканях.

Реакции десатурации и удлинения цепи более интенсивно протекают в печени, чем в экстрагепатических тканях. Замечено, что при голодании и диабете процессы десатурации ингибируются.

Несмотря на то что полиненасыщенные жирные кислоты могут

окисляться в организме, они все же не являются важными источниками энергии. Окисление их происходит в митохондриях путем модификации ранее описанного процесса β -окисления и может быть изображено следующим образом:

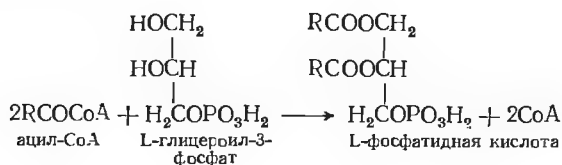


Наряду с известными ферментами пути β -окисления требуются еще три дополнительных фермента, обозначенных как А, В и С над стрелками в вышеприведенных уравнениях. Фермент А — $\Delta^3\text{-цис}, \Delta^2\text{-транс-еноил-CoA}$ —изомераза, В — $\Delta^2\text{-цис-еноил-CoA}$ —гидраза и С — 3-оксиацил-CoA—эпимераза. Скорости окисления моно- и диеновых кислот близки.

Арахидоновая и гомо- γ -линоленовая кислоты являются первичными источниками простагландинов (гл. 19).

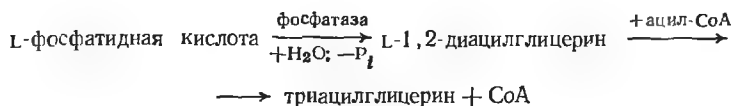
17.9. Синтез триацилглицеринов

В животных организмах свободные жирные кислоты не встречаются в значительных количествах в тканях или жидкостях тела. Как правило, жирные кислоты присутствуют в виде сложных эфиров. Синтез триацилглицеринов происходит главным образом в печени и в жировой ткани из CoA-производных жирных кислот через фосфатидную кислоту. Последняя является предшественником как триацилглицеринов, так и некоторых фосфоглицеридов (гл. 18) и образуется по реакции

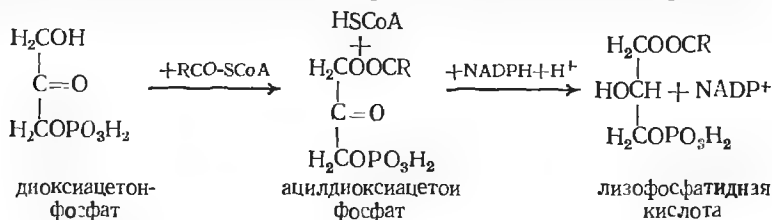


Эта реакция специфична к глицерол-3-фосфату и протекает преимущественно с насыщенными и ненасыщенными CoA-производными C_{16} - и C_{18} -жирных кислот. Глицерол-3-фосфат образуется или из свободного глицерина, который фосфорилируется глицеролкиназой и АТФ (разд. 17.5), или при восстановлении диоксиацетонфосфата (разд. 14.4.2).

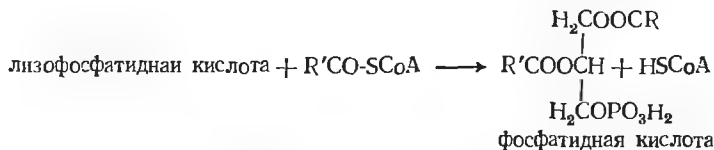
Гидролиз фосфатидной кислоты *фосфатазой* дает 1,2-диацилглицерин, который в свою очередь реагирует с другой молекулой ацил-CoA, образуя нейтральный триацилглицерин.



Помимо приведенного выше пути образования фосфатидной кислоты в печени происходит ацилирование диоксиацетонфосфата



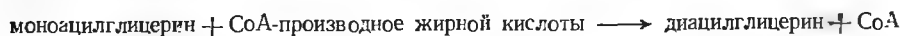
Соответствующая *трансацилаза* обнаружена как в митохондриях, так и в микросомах и обладает специфичностью к насыщенным жирным кислотам. Восстановление до лизифосфатидной кислоты осуществляется микросомальным ферментом. Второе ацилирование микросомальным ферментом, использующим CoA-производное ненасыщенной жирной кислоты, дает фосфатидиновую кислоту



Отметим, что непосредственное диацилирование глицерол-3-фосфата приводит к беспорядочному включению насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, в то время как последовательное ацилирование через диоксиацетонфосфат дает асимметрические молекулы, характерные для многих природных триацилглицеринов и фосфоглицеридов; например, фосфатидилхолин плазмы, печени, почек и мозга является в основном асимметричным. Однако фосфатидилхолин легочной ткани содержит в обоих положениях преимущественно пальмитиновую кислоту.

В слизистой оболочке кишечника триацилглицерины синтезируются из свободных жирных кислот и моно- и диацилглицеринов. Путь синтеза триацилглицеринов из свободных жирных кислот и 1,2-диацилглицеринов является несомненно таким же, как приведенный выше. Однако встраивание моноацилглицеринов в триацилглицерины, которые появляются в хилусе, является процессом,

свойственным только слизистой оболочке кишечника. Микросомальная система кишечника крысы и кролика катализирует следующую реакцию:



В подобных условиях микросомы печени не способны катализировать эту реакцию.

У *Clostridium butyricum* и у *E. coli* лизофосфатидная и фосфатидная кислоты могут быть синтезированы ацилированием глицерол-3-фосфата производными ацил-АТФ. Действительно, последние лучше утилизируются при этом синтезе, чем соответствующие ацил-CoA.

17.10. Регуляция метаболизма липидов

Основным источником углерода для синтеза жирных кислот являются углеводы. Если последние обеспечивают потребность организма в калориях, синтез жирных кислот прекращается. При наличии избытка калорий в виде жирных кислот последние подвергаются взаимопревращениям как описано выше, а также откладываются в тканях преимущественно в виде триацилглицеринов. Наряду с этим жирные кислоты пищи непрерывно направляются в русло образования сложных липидов, но скорость и масштаб этих процессов невелики по сравнению с синтезом триацилглицеринов, взаимопревращениями жирных кислот или окислением жирных кислот. Хотя при физиологических условиях как синтез, так и окисление жирных кислот происходят одновременно, эти два процесса протекают с неодинаковыми скоростями; один или другой могут существенно преобладать.

17.10.1. Регуляция синтеза и депонирования липидов

Скорости синтеза жирных кислот, превращения избытка углеводов в жирные кислоты и депонирования липидов обычно регулируются рядом факторов. Поступление глюкозы в клетки зависит от действия инсулина (разд. 15.6.2), который, таким образом, контролирует доступность углеводов для синтеза гликогена. Однако способность депонировать гликоген ограничена. Наступающее вследствие поступления глюкозы повышенное образование и накопление цитрата и изоцитрата активирует ацетил-CoA—карбоксилазу (разд. 17.6.1) — скоростью лимитирующий фермент в синтезе жирных кислот. Наряду с этим прием богатой углеводами пищи, равно как и повышенное выделение тироксина, способствует подавлению синтеза цитрат-лиазы, в результате чего ускоряется образование из цитрата ацетил-CoA как исходного субстрата для

синтеза жирных кислот. При наличии ацетил-СоА стимулируется карбоксилирование пирувата (анаплероз, разд. 14.5) и ингибируется декарбоксилирование пирувата; в итоге ускоряется накопление NADPH, необходимого для синтеза жирных кислот (разд. 17.7). Активность фосфоенолпируваткарбоксилазы также повышается при голодании, диабете и при введении кортизола.

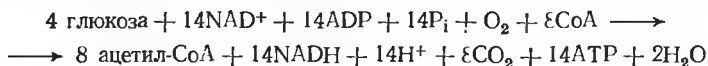
Ключевым ферментом в регуляции общей скорости распада и синтеза жирных кислот является *изоцитратдегидрогеназа* (разд. 12.2.2) — фермент цикла лимонной кислоты. Активность этого митохондриального фермента подвергается аллостерической регуляции посредством АТФ и АМР. При высоком уровне АТФ дегидрогеназа ингибирована, и цитрат накапливается и уходит из митохондрий, что приводит к его доступности в цитоплазме для деградации до ацетил-СоА и, следовательно, для липогенеза. Когда уровень АТФ низок и в митохондриях накапливается АМР, активность изоцитратдегидрогеназы значительно повышается, так как АМР является положительным эффектором этого фермента. В результате стимулируется активность всего цикла трикарбоновых кислот и лишь немного цитрата уходит из митохондрий. Показано, что аллостерическая регуляция активности изоцитратдегидрогеназы играет ключевую роль в обеспечении клеточных потребностей в АТФ, так как цикл лимонной кислоты является ответственным за удовлетворение основных энергетических нужд клетки.

В противоположность способности превращать углеводы в жирные кислоты организм млекопитающего не может осуществлять полное превращение жирных кислот в углеводы. Это обусловлено тем, что процесс образования ацетил-СоА и CO_2 из пирувата необратим, что препятствует непосредственному включению ацетил-СоА в предшественники углеводов. Так как жирные кислоты разрушаются до ацетил-СоА, единственным возможным путем, посредством которого углеродные атомы жирной кислоты могут затем войти в молекулу углевода, является конденсация ацетил-СоА с оксалоацетатом с последующим вступлением его в цикл лимонной кислоты. Один «оборот» этого цикла дает оксалоацетат, который содержит атомы углерода, первоначально присутствовавшие в исходной жирной кислоте. Однако при этом образуется только одна молекула оксалоацетата и одна молекула его требуется для конденсации с ацетил-СоА; следовательно, нет выигрыша в количестве оксалоацетата. Хотя щавелевоуксусная кислота является потенциально глюкогенным продуктом (при декарбоксилировании до пирувата и обращении гликолиза), в результате окисления жирных кислот не может достигаться *общий прирост* количества глюкозы. Только у растений наблюдается нетто-синтез углеводов из запасных жирных кислот (разд. 14.9.1) — процесс, который протекает в прорастающих семенах.

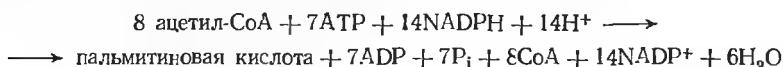
17.10.1.1. Энергетические аспекты липогенеза из углеводов

Как уже отмечалось, липогенез происходит в основном в цитоплазме из ацетил-СоА, в то время как образование ацетил-СоА из пировиноградной кислоты осуществляется в митохондриях. Транслокация ацетил-СоА происходит преимущественно путем образования лимонной кислоты; ацетил-СоА регенерируется в цитоплазме под действием цитрат-лиазы (разд. 14.5.1). Ацетильная группа может быть также транспортирована через карнитиновый челнок.

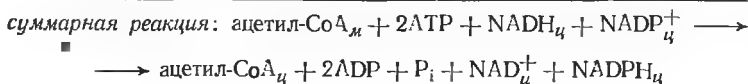
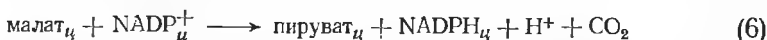
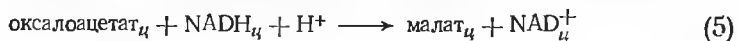
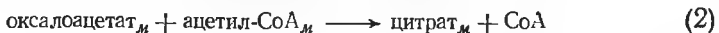
Превращение глюкозы в пальмитиновую кислоту описывается суммарной реакцией, показывающей образование необходимого количества единиц ацетил-СоА.



Полный синтез пальмитиновой кислоты из ацетил-СоА может быть суммирован следующим образом:

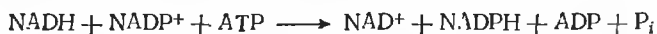


Хотя количество атомов углерода сбалансировано, окисление глюкозы дает NADH, в то время как синтез пальмитиновой кислоты требует NADPH, источником которого должно быть главным образом окисление глюкозо-6-фосфата с образованием рибулозо-5-фосфата + 2NADPH (разд. 14.8). В печени и жировой ткани, где преобладает липогенез, фосфоглюконатный цикл очень активен. Рибулозо-5-фосфат регенерируется при трансальдолазной и транскетолазной реакциях.



Некоторая часть требуемого NADPH, несомненно, образуется при объединенном действии двух групп реакций (а) и (б). Индексами «м» и «с» обозначена локализация метаболита в митохондриях или цитоплазме соответственно.

Если NADPH действительно образуется таким способом, то сумма вышеприведенных реакций должна указывать на утилизацию двух АТФ для осуществления трансгидрогеназной реакции, т. е. для образования одной молекулы NADPH из одной молекулы NADH. Количество требуемого для этого процесса АТФ, вероятно, рассчитано с избытком. Согласно ряду данных, в реакции трансгидрогенирования от NADH к NADPH нужна как правило одна молекула АТФ.



Процесс зависит от транспорта пирувата, цитрата и малата через митохондриальную мембрану, которая непроницаема для других реагирующих веществ.

Энергетические эквиваленты превращения углеводов в жиры могут быть оценены если принять, что $1 \text{ NADH} \approx 3 \text{ АТФ}$; $\text{NADPH} \approx 1 \text{ NADH} + 1 \text{ АТФ} \approx 4 \text{ АТФ}$; $1 \text{ FADH}_2 \approx 2 \text{ АТФ}$; $1 \text{ ацетил-CoA} \approx 12 \text{ АТФ}$. Исходя из этих величин, можно рассчитать, что синтез трипальмитата требует 500 экв. АТФ, в то время как его последующее полное окисление дает 409 экв. АТФ, т. е. общая эффективность составляет около 80%. Более того, при этом не принимаются во внимание какие-либо другие потери энергии в реакциях транслюкации (а) и (б). Таким образом, организм животного способен хранить энергию в виде жира, и, хотя часть энергии расходуется при этом, важность такого депонирования избытка калорий для будущих нужд организма несомненна.

Реакции (а) и (б) модулируются дополнительными факторами. Ацетил-CoA стимулирует реакцию (1) карбоксилирования пирувата и ингибирует его декарбоксилирование, ускоряя таким образом обеспечение всего процесса NADPH путем вышеприведенных реакций и стимулируя синтез жирных кислот.

17.10.2. Мобилизация депонированных липидов и липидов печени

Триацилглицерины, депонированные в жировой ткани, представляют собой основной резервуар субстратов для окислительного метаболизма. Мобилизация, распределение и окисление жирных кислот могут происходить со скоростями, которые достаточны для обеспечения субстратами по крайней мере 50% окислительного метаболизма тела. Это происходит при различных обстоятельствах, например при голодании, воздействии холода, физических упражнениях, воспроизведении и росте. Общий стимул для мобилизации жирных кислот при этих различных условиях обеспечивается путем повышенной секреции липидмобилизующих гормонов (см. ниже). Главным местом деградации жирных кислот до ацетоацетил-

СоА является печень. Таким образом, транспорт липидов из жировых депо в печень и обратно играет существенную роль в метаболизме.

17.10.2.1. Мобилизация депонированных липидов

Даже у животного, получающего достаточное по калорийности питание, значительная часть депонированных липидов ежедневно используется (разд. 17.6 и далее), поступает в кровоток и доставляется к различным органам. Особенно быстро мобилизуются липиды, поступающие к печени; здесь липиды могут храниться в течение длительного времени или распадаться по реакциям, обсуждавшимся ранее (разд. 17.5 и далее). Выходящие из жировых клеток липиды транспортируются в виде свободных жирных кислот, связанных с сывороточным альбумином (разд. 17.3.1). Выход свободных жирных кислот сопровождается появлением в плазме также и глицерина, хотя в значительно меньшем количестве, чем соответствующих жирных кислот. Высвобождаемые из жировых клеток жирные кислоты образуются из депонированных триацилглицеринов; гидролиз катализируется определенным ферментом — гормоночувствительной липопроотеидлипазой, которая отличается от фермента плазматических мембран жировых клеток, служащего для асиммiliaции триацилглицеринов (разд. 17.3.1). Активность внутриклеточного фермента (ферментов) контролируется циклическим АМР под действием различных гормонов.

7.10.2.2. Влияние гормонов на мобилизацию липидов

Ряд гормонов вызывает мобилизацию липидов из депо при добавлении к жировой ткани *in vitro* или при введении подопытным животным. В целом последовательность процессов следующая: 1) превращение триацилглицеринов в жирные кислоты внутри жировой ткани; 2) высвобождение жирных кислот в кровь — процесс, на который существенно влияет сывороточный альбумин, и 3) окисление и в присутствии соответствующего количества глюкозы ретерификация части освободившихся жирных кислот до триацилглицеринов. Кроме этого, *in vivo* происходит 4) доставка жирных кислот кровотоком к различным органам и тканям с утилизацией для синтеза триацилглицеринов и фосфолипидов и 5) выход триацилглицеринов и фосфолипидов из печени в виде липопротеидов, что приводит к липемии.

В число гормонов, известных своей активностью в процессе мобилизации липидов из жировой ткани, входят эпинефрин и норэпинефрин, стероиды надпочечников, глюкагон и гормоны гипофиза — вазопрессин, тиротропин, адrenокортикотропин, лютеотропин, соматотропин и β - и γ -липотропины. Кроме этого, серотонин (разд.

24.1.9), иногда причисляемый к классу гормонов, также оказывает воздействие на выход жирных кислот из жировой ткани *in vitro*. Эти гормоны стимулируют липолиз и *in vitro* ингибируют стимуляцию инсулином синтеза триацилглицеринов в жировой ткани.

Вывосвобождение жирных кислот из жировой ткани человека поразительно увеличивается при опухоли мозговой части надпочечников (*феохромоцитоме*), приводящей к избыточной секреции адреналина; при этом концентрация свободных жирных кислот в плазме может во много раз превышать норму. Адренокортикотропин действует непосредственно на жировую ткань, кроме того, этот гормон влияет на кору надпочечников (гл. 45). Все другие перечисленные выше гормоны оказывают такое же непосредственное влияние на жировую ткань. Широкое разнообразие гуморальных агентов, стимулирующих выход липидов из жировой ткани, может объяснить гиперлипемии и отложение липидов в печени, имеющие место при различных состояниях в эксперименте и в клинике (см. ниже).

17.10.2.3. Печеночные яды и мобилизация липидов

Механизм, посредством которого различные вещества, индуцирующие повреждение печени, могут вызывать мобилизацию липидов из жировых депо, не ясен, несмотря на то, что это явление известно давно. Хлорированные алифатические и ароматические углеводороды являются мощными гепатотоксическими агентами, вызывающими накопление липидов в печени. Так, в клинической медицине часто встречается отравление четыреххлористым углеродом, потому что он летуч и широко используется в промышленности.

Жировое перерождение печени часто наблюдают в клинике в условиях, когда явного отравления нет. Так, при хронических инфекционных заболеваниях, таких, как туберкулез, и метаболических нарушениях, включая голодание, содержание липидов в печени может заметно возрасти. Наиболее поразительные случаи жировой инфильтрации наблюдались у больных с выраженным, нелеченным диабетом в доинсулиновую эпоху (т. е. когда инсулин еще не был известен). Как указано ниже, в печени больных диабетом жирные кислоты синтезируются в меньшей степени, чем в норме, но в то же время отмечается нормальная способность к деградации жирных кислот. Очевидно, жировое перерождение печени при этом заболевании объясняется, в виде исключения, повышенной миграцией липидов из жировых депо к печени, и наблюдаемая при диабете липемия частично обусловлена липидами, транспортируемыми из жировых депо. Стимулирующее действие ряда гормонов на мобилизацию липидов из депо позволяет полагать, что большинство клинических случаев жирового перерождения печени обусловлено избыточно быстрой мобилизацией депонированных липидов. С другой стороны, накопление липидов в условиях отравления печени может возникать как в результате ускоренной мобилизации резервных липидов в других тканях, так и как следствие понижения способности поврежденных печеночных клеток к расщеплению жирных кислот.

17.10.2.4. Мобилизация липидов печени

После открытия инсулина стало возможным поддерживать собаку с полностью удаленной поджелудочной железой в относительно-

но хорошем состоянии. Однако, даже когда вводили необходимое для компенсации диабета количество инсулина, у животного все равно развивалось выраженное жировое перерождение печени, которое могло быть излечено или предотвращено добавлением к пище фосфатидилхолина или холина. Кроме того, жировое перерождение печени наблюдается у крыс при кормлении пищей с низким содержанием холина и белка: в этом случае оно может быть излечено или предотвращено добавлением холина.

Жировое перерождение печени, наблюдаемое у таких подопытных животных, возникает в связи с действием механизма, иного чем рассмотренный ранее. Холин является компонентом фосфатидилхолина, и способность печени генерировать фосфатидилхолин зависит от поступления холина или метильных групп S-аденозилметионина, обеспечивающих синтез холина (разд. 24.4.2.10). Термин *липотропное вещество* был введен для обозначения соединений, обладающих свойством предотвращать или излечивать жировое перерождение печени при недостатке холина.

Эти данные показывают, что хотя жирные кислоты поступают в печень в различной форме, как свободные, так и в виде эфиров с глицерином или холестерином, и, кроме того, синтезируются в печени из углеводных или аминокислотных предшественников, они выходят из печени, будучи связанными с белками не только в этих формах, но также и в виде холинсодержащих фосфолипидов в составе липопротеидов. Согласно общепринятой точке зрения, печень является основным местом синтеза фосфолипидов плазмы. Поэтому в случае, когда доступность холина или метильных групп для его синтеза ограничена, снижается скорость синтеза фосфатидилхолина и, следовательно, и скорость, с которой жирные кислоты выводятся из печени. Если другие процессы продолжаются с нормальной скоростью, это приводит к накоплению липидов в печени.

Любое вещество, способное давать метильные группы для синтеза холина, является липотропным. В противоположность этому вещества, которые забирают метильные группы из синтеза холина, могут при соответствующих условиях способствовать ожирению печени под влиянием диеты. Гуанидинуксусная кислота (разд. 22.2) и никотинамид (гл. 50) являются примерами антилипотропных веществ, которые необратимо метилируются в организме.

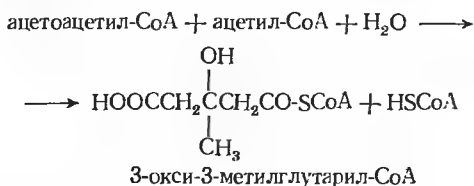
Некоторые последствия недостаточности метильных групп связаны, безусловно, со сниженным уровнем карнитина, для синтеза которого нужны три метильные группы (разд. 22.3). При истощении карнитина у подопытных животных снижена скорость окисления длинноцепочечных жирных кислот и накопления триацилглицеринов в тканях; однако окисление жирных кислот с короткой цепью не затрагивается.

17.10.3. Кетоновые тела и кетоз

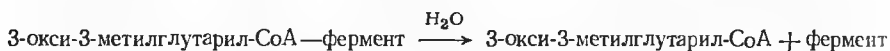
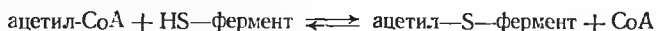
Дегградация и синтез жирных кислот обычно происходят без существенного накопления промежуточных продуктов. Однако при некоторых обстоятельствах в крови накапливается ряд продуктов; общепринятое, хотя и не совсем правильное их название — *кетонотелы*. Это ацетоуксусная кислота, β -оксимасляная кислота и ацетон. Все эти продукты берут начало от ацетоацетил- CoA , который образуется при конденсации двух молекул ацетил- CoA по принципу «голова к хвосту»; эта реакция катализируется митохондриальным ферментом *ацетил- CoA -ацетилтрансферазой*.



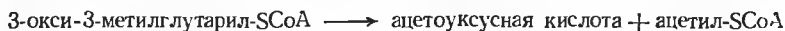
Основным путем ацетоацетил- CoA в печени является превращение его в 3-окси-3-метилглутарил- CoA , важное промежуточное вещество в биогенезе холестерина и стероидов (разд. 18.3.1) и в дегградации лейцина (разд. 23.2.10).



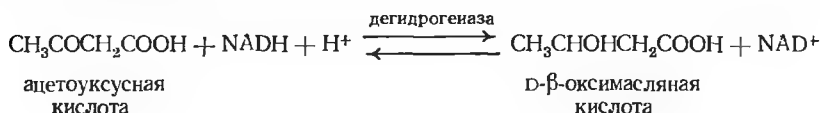
Реакция идет в три стадии.



Расщепление 3-окси-3-метилглутарил- CoA *гидроксиметилглутарил- CoA -лиазой* является основным путем образования ацетоацетата в печени.



Восстановление ацетоацетата катализируется специфическим ферментом, связанным с внутренней мембраной митохондрий, — β -оксibuтиратдегидрогеназой и дает D- β -оксимасляную кислоту. Напротив, восстановление ацетоацетил- CoA катализируется β -оксинацил- CoA -дегидрогеназой (разд. 17.5.3) и при этом образуется L- β -оксibuтирил- CoA .

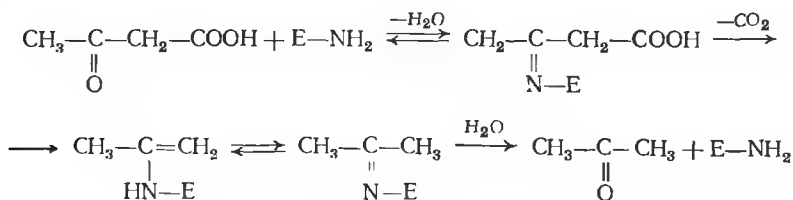


β -Оксибутиратдегидрогеназа митохондрий сердца быка может быть выделена в виде неактивного белка. Активность фермента восстанавливается при добавлении фосфатидилхолина. Это один из тех немногих известных ферментов, для которого была показана его активация фосфолипидными.

Хотя эта реакция обратима, отмечаются большие колебания в количествах и соотношении указанных двух кислот в кровотоке: при ситуациях, когда много гликогена в печени, предпочтительным является образование β -оксимасляной кислоты; когда гликогена печени относительно мало, преобладает ацетоацетат.

Выход ацетоацетата из печени является нормальным непрерывным процессом. Общая концентрация кетонных тел в крови, выраженная в виде концентрации β -оксимасляной кислоты, обычно ниже 3 мг/100 мл, и средняя общая ежедневная экскреция с мочой составляет приблизительно 20 мг. Это обусловлено эффективным механизмом удаления ацетоуксусной кислоты периферическими тканями, особенно скелетной и сердечной мышцами, которые получают значительную часть всей нужной им энергии за счет превращения этого соединения. Процесс начинается с образования CoA-производного ацетоуксусной кислоты путем переноса остатка CoA от сукцинил-CoA специфической тиафоразой (разд. 17.4.7), причем в печени этот путь или несуществен, или полностью отсутствует. Ацетоацетил-CoA расщепляется тиалазой (разд. 17.5.4), давая две молекулы ацетил-CoA, которые затем вступают в цикл лимонной кислоты.

Ацетон образуется из ацетоацетата при декарбоксилировании, катализируемом ацетоацетат-декарбоксилазой. Механизм этой реакции включает образование основания Шиффа между ферментом и субстратом, сопровождаемое его декарбоксилированием и гидролизом.



Ацетон может метаболизироваться двумя путями; один из них включает расщепление с образованием двууглеродного ацетильного и одноуглеродного формильного фрагментов, которые затем подвергаются реакциям, характерным для каждой из этих групп. Другим путем метаболизма ацетона является превращение его в пропандиол, из которого образуется пировиноградная кислота.

17.10.4. Взаимоотношения процессов метаболизма липидов

Центральная роль ацетил-СоА и 3-окси-3-метилглутарил-СоА в метаболизме липидов проиллюстрирована на рис. 17.5.

В условиях ограниченной утилизации углеводов и/или усиленной мобилизации жирных кислот для оттока в печень существенно снижается скорость двух из трех путей метаболизма ацетил-СоА, а именно цикла лимонной кислоты и синтеза жирных кислот. Первый эффект частично основан на ослаблении стимулирующего действия промежуточных продуктов углеводного обмена на цитратлиазу; подавление активности этого фермента может задерживать процессы цикла лимонной кислоты. Ограничение синтеза жирных кислот в печени в условиях сниженного образования промежуточных продуктов цикла лимонной кислоты и более интенсивного притока жирных кислот объясняется падением уровня ацетил-СоА—карбоксилазной активности (разд. 17.6.1). В результате ацетил-СоА направляется в его третий метаболический путь, включающий образование 3-окси-3-метилглутарил-СоА и продуктов, синтезируемых из него, например холестерина и ацетоацетата. Усиленно образование последнего и связанных с ним β -оксимасляной кислоты и ацетона повышает их концентрацию в крови выше нормальных величин, приводя к *кетонемии*. Если уровень этих веществ в плазме превышает таковой в почках, то в моче появляется значительное количество кетонových тел, и возникает *кетонурия*. В тех случаях, когда имеет место выраженная кетонемия или кетонурия, в

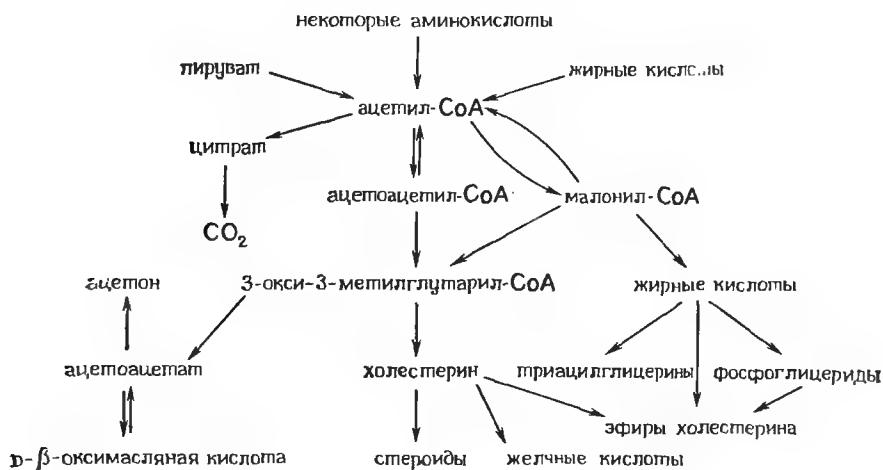


Рис. 17.5. Схема основных взаимоотношений метаболизма жирных кислот, холестерина и кетонových тел.

выдыхаемом воздухе можно ожидать обнаружения запаха ацетона. Эти три симптома — кетонемия, кетонурия и запах ацетона при дыхании объединяются под общим названием *кетоз*.

17.10.4.1. Причины кетоза

Любое обстоятельство, связанное с пониженной доступностью углеводов, будет усиливать утилизацию жирных кислот. При голодании запасы гликогена быстро истощаются, и возможность выживания зависит от энергии, получаемой из депонированных липидов. Мобилизация этих липидов проявляется в липемии. Дегградация жирных кислот в печени происходит более быстро, чем обычно, с усилением образования ацетоацетил-СоА, ацетил-СоА и продуктов их превращения. Наряду с этим наблюдается дефицит оксалоацетата и, следовательно, снижение образования цитрата. Низкий уровень оксалоацетата в дальнейшем понижается еще в большей степени из-за его использования в глюконеогенезе. Это в дальнейшем приводит к подавлению процессов цикла трикарбоновых кислот.

Случаи кетоза, связанные с голоданием, наиболее часто встречаются в клинике при желудочно-кишечных расстройствах у детей или при беременности. К кетозу могут также приводить и другие факторы, возникающие у здоровых людей при избыточном метаболизме липидов и недостаточном метаболизме углеводов, как, например, при почечной глюкозурии (гл. 35), а также резкая замена обычной диеты диетой с низким содержанием углеводов и высоким содержанием липидов.

Причиной кетоза часто является *сахарный диабет*. При диабете в противоположность вышеприведенным ситуациям глюкоза присутствует в избыточном количестве в жидкостях тела; однако метаболический дефект, а именно недостаточность инсулина, препятствует утилизации глюкозы с нормальной скоростью. С этой точки зрения влияние на липидный метаболизм диабета и голодания подобны друг другу. При диабете, несмотря на гипергликемию, глюкоза не используется с нормальной скоростью в мышцах и в печени. Избыточная мобилизация липидов из депо приводит к липемии и жировому перерождению печени. Генерация ацетоацетил-СоА из жирных кислот происходит в печени с чрезмерно большой скоростью, в то время как ресинтез жирных кислот ингибирован. Если ацетоацетат образуется со скоростью, превышающей способность экстрагепатических тканей к его утилизации, то будет развиваться кетоз. У больных диабетом с выраженным кетозом выведение кетоновых тел с мочой может достигать до 5000 мг/24 ч, а концентрация их в крови может достигать 90 мг/100 мл по сравнению с нормальными величинами < 125 и < 3 мг соответственно.

17.10.4.2. Последствия кетоза

Осложнения, наблюдаемые в тех случаях, когда кетоновых тел образуется больше, чем может утилизироваться, связаны преимущественно с характером выведения ацетоуксусной и β -оксимасляной кислот. Эти два вещества относятся к умеренно сильным кислотам и даже в наиболее кислой моче, которую могут экскретировать почки, существуют большей частью в виде анионов (гл. 35). Катионы, главным образом Na^+ , теряются при экскреции этих анионов. Обеднение плазмы и других жидкостей тела катионами приводит к ацидозу (гл. 33), часто называемому *кетоацидозом*.

Одновременно с экскрецией солей ацетоуксусной и β -оксимасляной кислот (так же как и глюкозы у больных с диабетом) с мочой выводится большое количество жидкости. Тенденция к тошноте и рвоте может вызвать дополнительную потерю жидкости, в то время как угнетение центральной нервной системы, приводящее в конечном итоге к коме с арефлексией, препятствует нормальному потреблению воды. Все эти факторы осложняют ацидоз, вызывая выраженное обезвоживание.

Осложнения хронического кетоза могут быть в значительной степени объяснены ацидозом, возникающим вследствие потери Na^+ , и обезвоживанием в результате некомпенсированной потери жидкости. Обезвоживание и ацидоз, обусловленные кетозом, при этом заболевании сопровождаются наличием запаха ацетона при дыхании и присутствием кетоновых тел в моче. Если причиной является диабет, почти всегда наблюдаются также глюкозурия и гипергликемия.

17.11. Метаболизм этанола и алкоголизм; связь с метаболизмом липидов

Потребление этанола в умеренных количествах помимо психологического эффекта вносит дополнительные калории в рацион за счет окисления спирта до ацетата и превращения последнего в ацетил-СоА, который входит в обычный для этого вещества метаболический путь. Потребление этанола в больших количествах вызывает ряд метаболических проблем в связи с полным повреждением тканей — эффект, существенно отличающийся в зависимости от индивидуальной восприимчивости, диеты и других факторов.

Алкоголь, будучи свободно растворимым в воде, быстро всасывается приблизительно на 20% из желудка и на 80% из кишечника. Однократная доза может обнаружена в крови через 5 мин, причем максимум содержания достигается через $1\frac{1}{2}$ —2 ч. Всасывание, однако, снижается при одновременном или предварительном потреблении жирной пищи. В тканях этанол не накапливает-

ся; он достигает всех органов тела. Потребление алкоголя в больших количествах в течение длительного периода вызывает воспалительные процессы в желудке, кишечнике и поджелудочной железе с разобщением процессов переваривания и всасывания, так же как и вторичные воздействия на центральную нервную систему, часто связанные с недостаточным питанием вследствие низкого потребления белков и малого приема витаминов. Полиневропатический синдром Вернике — Корсакова снимается при введении тиамина, но при этом может наблюдаться также недостаточность фолата и ниацина. Эта пищевая недостаточность, возникающая в значительной степени из-за высокого потребления алкоголя, связана в целом с низким потреблением пищи, содержащей адекватные количества других продуктов, например белков и витаминов.

Алкогольдегидрогеназа печени является первичным ферментом метаболизма этанола



Как уже отмечалось (разд. 14.9.4), ацетальдегид окисляется до ацетата главным образом в печени с помощью трех различных ферментов: железомолибдофлавопротеида *альдегидоксидазы*, железомолибдофлавопротеида *ксантиноксидазы* и NAD-зависимой *альдегидоксидазы*. Образующийся в результате ацетил-СоА утилизируется затем обычным путем. Образование как ацетил-СоА, так и NADH и последующее образование АТФ приводят к экономии жирных кислот, имеющих тенденцию к накоплению. Высокий уровень NADH может привести к восстановлению пирувата в лактат (разд. 14.4.2), который вызывает слабый ацидоз, обусловленный накоплением молочной кислоты и, следовательно, более высокий, чем в норме, уровень глюкозы в крови из-за низкой скорости глюконеогенеза из пирувата (разд. 14.6.1). У лиц, страдающих алкоголизмом, иногда наблюдается избыточное образование кетоновых тел вследствие пониженной доступности глюкозы; это напоминает кетоз у страдающих диабетом и приводит к последствиям, описанным выше.

При хроническом алкоголизме возможна также избыточная мобилизация липидов и, как правило, жировое перерождение печени, что не всегда облегчается введением холина. Механизм возникновения жирового гепатита не совсем ясен, он представляет собой комбинацию нескольких факторов: экономии триацилглицеринов печени за счет окисления этанола, усиленной мобилизации триацилглицеринов жировой ткани и их притока в печень, что частично связано с триггерным действием этанола на высвобождение гормонов, и неспособностью синтезировать достаточное количество липопротеинов для транспорта триацилглицеринов вследствие изменения количества аминокислот.

При жировом перерождении печени наблюдается выраженная инфильтрация клеток печеночной паренхимы триацилглицеринами. Приблизительно у 10% больных тяжелыми формами алкоголизма это приводит к циррозу — избыточному образованию фиброзной ткани, которая разрушает нормальную структуру печени.

См. литературу к гл. 18.

Глава 18

МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ. II

*Фосфолипиды. Сфинголипиды.
Метаболизм стероидов и его регуляция.
Нарушения метаболизма липидов*

18.1. Фосфолипиды

Фосфолипиды выполняют ряд важных биологических функций. Как большинство полярных липидов, они являются амфифильными соединениями (гл. 3), несущими гидрофобные и гидрофильные группы. Некоторые фосфолипиды, например фосфатидилхолин, представляют собой диполярные ионы, обладающие катионной и аннионной группами, и являются основными компонентами клеточных мембранных систем (разд. 11.3.1). Например, в миелиновом волокне нерва фосфолипиды и цереброзиды составляют приблизительно 60% сухого веса (гл. 37).

18.1.1. Распределение и обмен

Среди липидов тела фосфолипиды распределены неравномерно. Богатыми источниками фосфолипидов являются липиды тканей различных желез, в особенности печени, а также плазма крови, где они могут составлять до половины всех липидов. Фосфолипиды являются также преобладающими липидами в желтках птичьих яиц и в семенах бобовых растений.

Обмен различных фосфолипидов в определенных местах животного организма изучали с использованием различных изотопов, наиболее часто ^{32}P . Период полупревращения этих липидов колеблется от менее одного дня для фосфатидилхолина печени до более 200 сут для фосфатидилэтаноламина мозга.

18.1.2. Образование

18.1.2.1. Фосфатиды

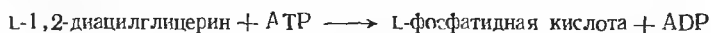
Фосфатиды (глицерофосфатиды) составляют главный класс фосфолипидов (разд. 3.3.2.1). Эти производные глицерофосфата обычно содержат азотистые основания — серин, этаноламин или

холлин, которые могут быть синтезированы организмом. Наиболее распространенный фосфатид — фосфатидилхолин — может быть синтезирован двумя основными путями: 1) синтезом *de novo* из фосфатидилэтаноламина и 2) утилизацией экзогенного холина из пищевых или других источников.

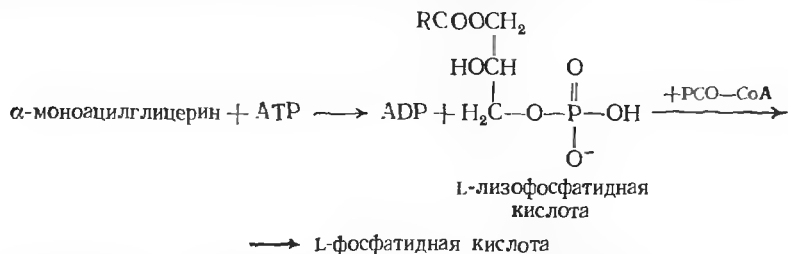
Фосфатидная кислота. Ключевым веществом при некоторых реакциях синтеза фосфатидов является фосфатидная кислота. Образование ее из глицерол-3-фосфата или из диоксиацетонфосфата и 2 молей ацил-СоА уже было описано (разд. 17.9). Наряду с этим возможны и другие пути образования фосфатидной кислоты из триацилглицеринов. В целом эти пути могут быть представлены следующим образом:



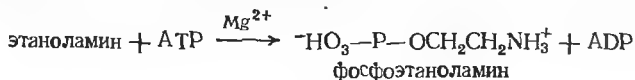
1,2-Диацилглицерин превращается в фосфатидную кислоту с помощью киназы:



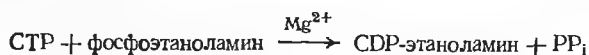
Ферменты ткани мозга и слизистой оболочки кишечника превращают моноацилглицерин в L-лизофосфатидную кислоту, которая затем превращается в фосфатидную кислоту.



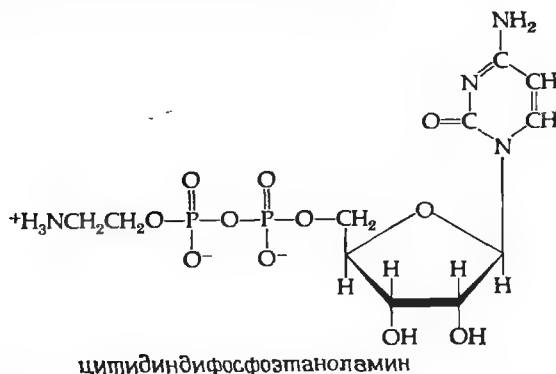
Образование фосфатидилэтаноламина. Предшественником этого фосфатида является этаноламин, который фосфорилируется киназой с образованием фосфоэтаноламина.



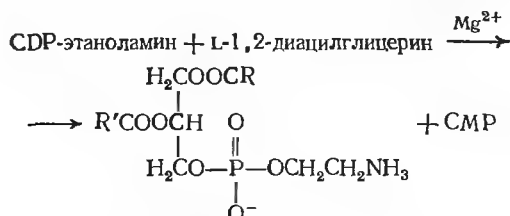
Фосфоэтаноламин реагирует с цитидинтрифосфатом (СТР) с образованием цитидиндифосфоэтанолamina



CDP-этаноламин имеет следующую структуру:

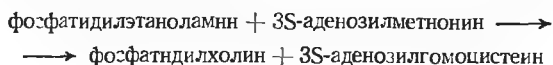


CDP-этаноламин затем превращается в фосфатид по реакции



1,2-Диацилглицерин может образовываться из триацилглицерина или при действии фосфатазы на фосфатидную кислоту. Последний путь преобладает, так как фосфатиды млекопитающих, в том числе фосфатидилхолин (см. ниже), обычно содержат в качестве R насыщенную жирную кислоту, а в качестве R' — ненасыщенную жирную кислоту. Как уже отмечалось (разд. 17.9), такой состав жирных кислот может быть обеспечен в тех случаях, когда источником для образования 1,2-диацилглицерина служит фосфатидная кислота или диацилглицерин образуется через диоксанацетонфосфат.

Образование фосфатидилхолина. Этот процесс происходит путем последовательного переноса метильной группы от трех молекул S-аденозилметионина (разд. 21.4.2.10) к фосфатидилэтанолмину.

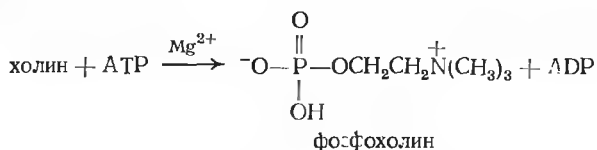


Это метилирование, которое происходит главным образом в печени и только с фосфатидилэтаноломином в качестве субстрата, представляет собой механизм эндогенного образования холина.

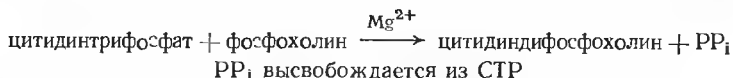
У *Neurospora* в метилировании участвуют два фермента. Один катализирует первоначальное метилирование до фосфатидилмонометилэтанолamina, а другой катализирует введение второй и третьей метильных групп, образуя соответственно диметилэтанолamin и холинсодержащие фосфатиды. Некоторые данные о подобном постепенном введении метильных групп получены также для микросом печени и для *Agrobacteria*; последние отличаются наличием фосфатидилхолина, который или отсутствует у большинства бактерий, или присутствует в следовых количествах.

Путь синтеза фосфатидилхолина *de novo* является недостаточным для обеспечения всех потребностей организма млекопитающего в холине (разд. 17.10.2), поэтому необходим пищевой источник холина. Это особенно важно с точки зрения образования фосфатидилхолина из свободного холина. Этот процесс включает утилизацию цитидиндифосфохолина как ключевого промежуточного вещества; его структура подобна структуре CDP-этанолamina, и синтезируется он путем аналогичных реакций.

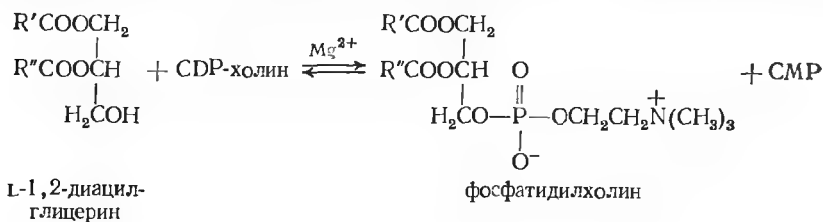
Фосфохолин образуется в киназной реакции, подобной таковой с этаноломином.



Образование CDP-холина из CTP и фосфохолина происходит аналогично образованию CDP-этанолamina из CTP и фосфоэтанолamina

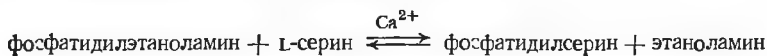


Взаимодействие цитидиндифосфохолина (CDP-холина) с 1,2-диацилглицерином дает фосфатидилхолин и цитидинмонофосфат

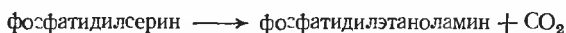


Большими потребностями в фосфатидилхолине отличаются мозг и другие типы нервных тканей (гл. 37). Согласно некоторым данным, может происходить и метилирование свободного этаноламина.

Образование фосфатидилсерина. У млекопитающих фосфатидилсерин образуется по реакции обмена

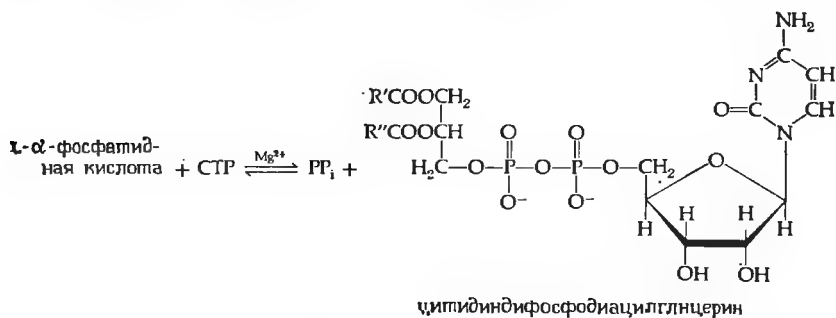


Фосфатидилсерин декарбоксилируется *фосфатидилсерин-декарбоксилазой*, представляющей собой митохондриальный фермент.

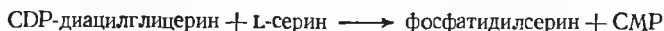


Конечным результатом реакций обмена и декарбоксилирования является превращение серина в этаноламин. Это обеспечивает дополнительный резерв этаноламина для синтеза *de novo* фосфатидилхолина, как описано выше. *Фосфатидилсерин-декарбоксилаза E. coli* локализована в мембране и содержит связанный с NH_2 -концевой группой остаток пировиноградной кислоты, который является существенным для действия фермента. Предполагаемый механизм действия таких декарбоксилаз обсуждается в разд. 22.5.3.

Фосфатидилсерин *E. coli* и других бактерий образуется через цитидиндифосфодиацилглицерин (CDP-диацилглицерин), который в свою очередь образуется из L-фосфатидной кислоты



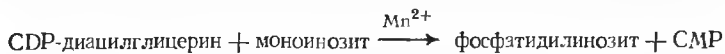
Следующая стадия приводит к образованию фосфатидилсерина:



У этих бактерий фосфатидилсерин декарбоксилируется, давая фосфатидилэтаноламин, как описано выше.

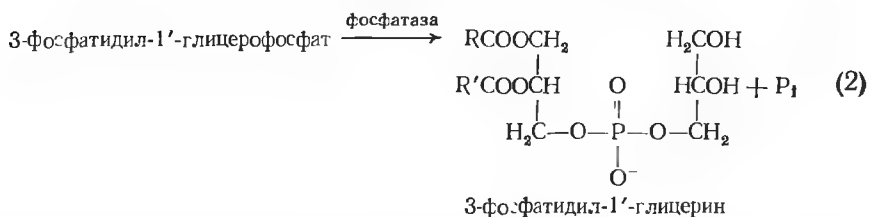
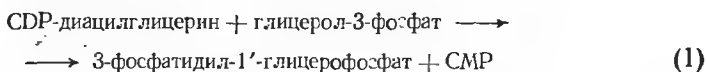
CDP-диацилглицерин образуется также в тканях млекопитающих и обеспечивает основной путь синтеза фосфатидилинозитидов и фосфатидилглицеринов.

Образование фосфатидилинозитидов и фосфатидилглицеринов. Производные глицерофосфата, не содержащие азота, широко распространены в природе и синтезируются путем реакций переноса.

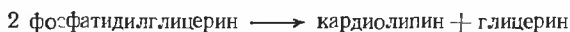


Образование ди- и трифосфоинозитидов (разд. 3.3.2) происходит путем последовательного фосфорилирования моноинозита сначала в 4-м, затем в 5-м положениях двумя специфическими киназами в присутствии АТФ и или Mg^{2+} , или Mn^{2+} . Особенно богаты трифосфоинозитидом миелиновые мембраны мозга и нервной ткани.

Фосфатидилглицерины (разд. 3.3.2.5) синтезируются при помощи такой же реакции.



Дифосфатидилглицерин (кардиолипин) (разд. 3.3.2.3) образуется из двух молекул фосфатидилглицерина. При этом CDP-диацилглицерин, очевидно, требуется в качестве кофактора. Кардиолипин составляет 10% или более от липидов митохондриальной мембраны.



Взаимоотношения процессов синтеза фосфолипидов и триацилглицеринов показаны на рис. 18.1.

Образование плазмалогенов. Ацильная группа моноацильного производного диоксиацетонфосфата обменивается на жирный спирт (образованный восстановлением жирной кислоты) с удержанием α -водородных атомов и кислорода спирта. Природа этой реакции замещения неизвестна. О-алкилдиоксиацетонфосфат затем восстанавливается до О-алкилглицерилфосфата с участием NADPH или NADH в качестве доноров водорода. После этого происходит ацилирование с помощью CoA-производного жирной кислоты. Образовавшийся при этом 1-алкил-2-ацилглицерилфосфат затем подвергается дефосфорилированию и в ходе описанных ранее реакций превращается в алкильный аналог фосоглицеридов, содержащий холин, этаноламин или серин. 1-Алкил-2-ацилглице-

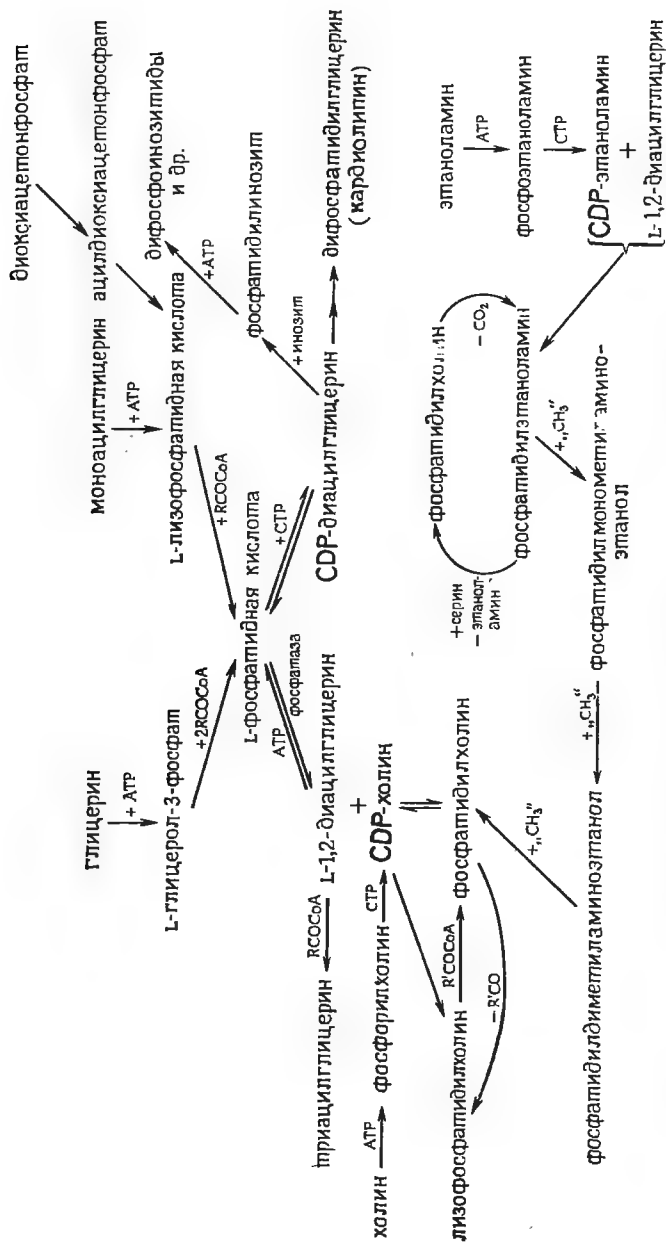


Рис. 18.1. Схема некоторых взаимосвязей синтеза фосфолипидов и триацилглицеринов у млекопитающих. «CH₃» обозначает метильную группу, которая переносится от S-аденозилметионина. Очевидно, что существуют метаболические пути, в которых глицерин, моноацилглицерины и диацилглицерины могут быть использованы для образования триацилглицеринов или фосфоглицеридов. Ключевым промежуточным продуктом является фосфатидная кислота.

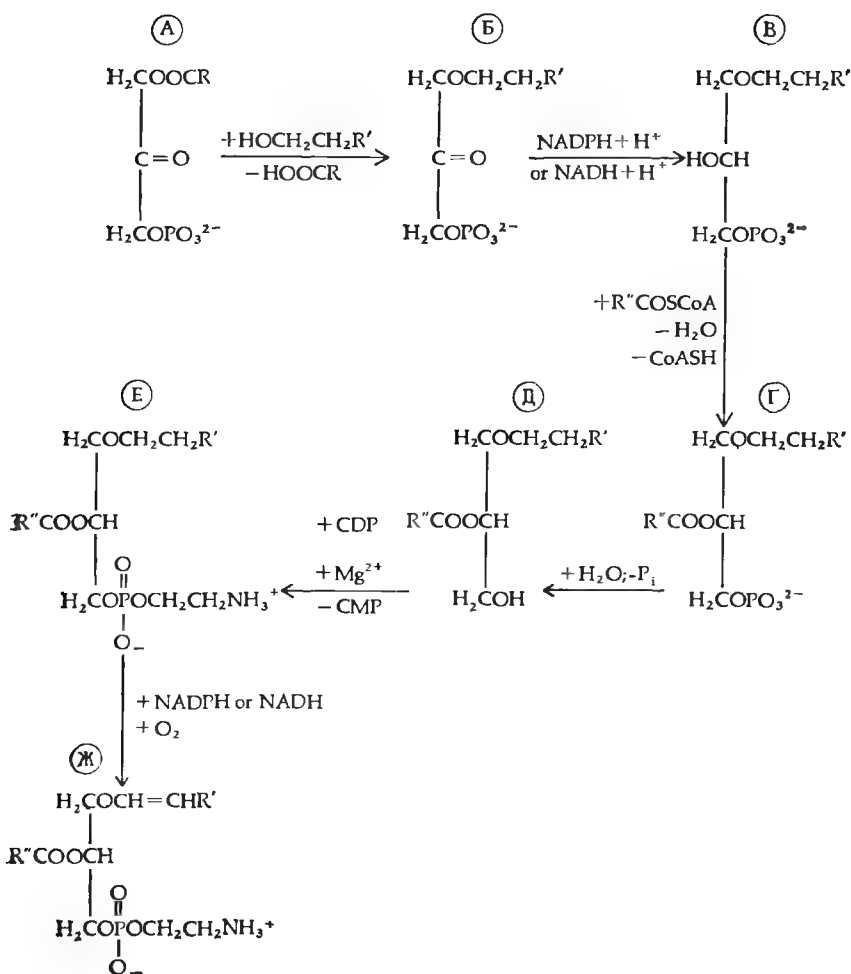
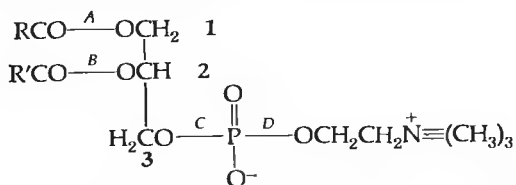


Рис. 18.2. Образование плазмалогена. А — моноацилдиоксиацетонфосфат; Б — 1-алкилдиоксиацетонфосфат; В — О-алкилглицерофосфат; Г — 1-алкил-2-ацилглицерофосфат; Д — 1-алкил-2-ацилглицерин; Е — 1-алкил-2-ацилфосфатидилэтанол-амин; Ж — содержащий этаноламин плазмалоген, или 1-алкенил-2-ацилфосфатидилэтанол-амин.

рилфосфозтаноламин превращается в плазмалоген под действием специфической десатуразы в присутствии O_2 и NADH или NADPH. Этот процесс изображен на рис. 18.2.

18.1.3. Действие фосфолипаз

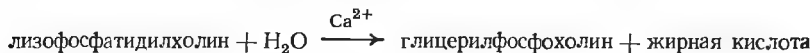
Известно несколько фосфолипаз, специфично гидролизующих одну или более связей в фосфолипидах. Эти ферменты с успехом применялись при изучении структуры фосфолипидов, а также при установлении путей их расщепления. На приведенной ниже формуле большими буквами обозначены связи в молекуле фосфатидилхолина, чувствительные к действию расщепляющих ферментов.



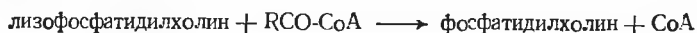
Ферменты, отщепляющие одну ацильную группу фосфолипидов, называются фосфолипазами А. Гидролиз связи А осуществляется фосфолипазой A_1 , связи В — фосфолипазой A_2 .

В результате действия фосфолипазы A_2 , присутствующей в виде профермента в соке поджелудочной железы, образуются лизофосфатидилхолин (разд. 3.3.2.1) — сильное ПАВ, обладающее к тому же мощным гемолитическим действием. Некоторые змеиные яды также содержат подобные ферменты, активные только в присутствии Ca^{2+} . Фосфолипаза A_2 расщепляет связь В также в фосфатидилэтаноламине и в холин- и этаноламинсодержащих плазмалогенах. Действие фосфолипазы A_2 приводит к высвобождению арахидоновой или гомо- γ -линоленовой кислот, исходных субстратов для синтеза простагландинов (гл. 19).

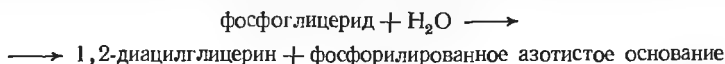
Лизофосфолипаза сока поджелудочной железы и других тканей катализирует гидролиз одной сложноэфирной связи в положении А лизофосфатидилхолина или лизофосфатидилэтаноламина.



Фосфолипаза В гидролизует как связь А, так и связь В. Наряду с фосфолипазами описан широко распространенный у млекопитающих фермент, катализирующий ресинтез фосфатидилхолина из его лизоформы и СоА-производного соответствующей жирной кислоты.



Фосфолипаса C, которая расщепляет связь C, найдена в α -токсине *Clostridium welchii* и других штаммов клостридий и бацилл.



Фосфолипаса D, которая была найдена только в растительных тканях, катализирует реакции переноса фосфатидильного остатка, так же как и гидролитическое расщепление концевой фосфодиэфирной связи (в положении D) глицерофосфатидов, содержащих холин, этаноламин, серин или глицерин с образованием фосфатидной кислоты.

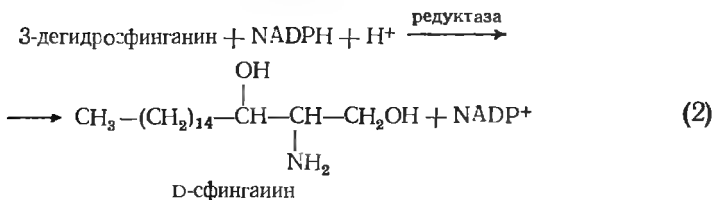
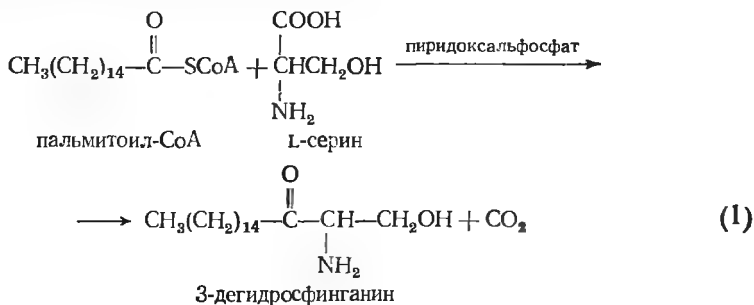


Обе реакции активируются Ca^{2+} . Реакцию (2), описывающую перенос фосфатидильного остатка, можно рассматривать в качестве механизма синтеза и обмена фосфолипидов.

18.2. Сфинголипиды

18.2.1. Образование сфингозинов

Длинноцепочечные алифатические основания, например сфинганин (дигидросфингозин) и сфингенин (сфингозин), синтезируются в животных тканях, например в мозге:



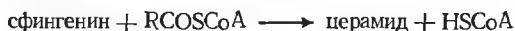
Заметим, что в реакции (1) карбоксильная группа серина теряет-ся в виде CO_2 и что углеродные атомы 1 и 2 получаемого продукта берут начало из α - и β -углеродных атомов серина, от которого ведет свое происхождение и аминогруппа. Реакция конденсации (1) идет с СоА-производными кислот от C_{14} до C_{18} , а реакция восстановления — с 3-дегидросфинганинами от C_{14} до C_{18} ; эти реакции дают известные C_{16} - и C_{18} -сфинганины.

Сфингенин может быть образован по реакциям (1) и (2) из СоА-производных гексадекановой кислоты и, вероятно, при дегидрировании сфинганина с образованием *транс*-соединения. Другой и, возможно, главный путь образования сфингенинов — десатурация СоА-производного жирной кислоты, предшествующая конденсации с серином; реакция катализируется флавиновой дегидрогеназой:



18.2.2. Образование церамидов

Церамиды (разд. 3.4.1.1), амиды жирных кислот и сфингенина, образуются из СоА-производных жирных кислот при действии *N*-ацилтрансферазы.

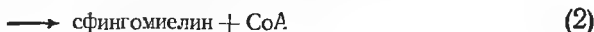
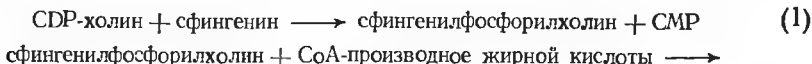


18.2.3. Образование сфингомиелинов

Существуют два пути для синтеза сфингомиелинов (разд. 3.4.1.1). Один из них, как полагают, ответствен за большую часть образуемого продукта и катализируется *CDP-холин:церамид-холинфосфотрансферазой* — ферментом, обнаруженным в митохондриях печени и в гомогенатах мозга и селезенки.



Другой путь образования сфингомиелина, который состоит из двух последовательных реакций, не имеет столь большого значения.

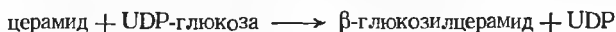


18.2.4. Образование гликосфинголипидов

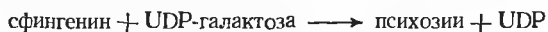
Синтез углеводсодержащих производных церамида включает перенос к молекуле церамида остатка сахара из соответствующего активированного нуклеотидного производного. Такими активированными компонентами могут быть UDP-глюкоза или галактоза, UDP-N-ацетилгалактозамин или CDP-N-ацетилнейраминавая кислота. Ферменты, катализирующие эти реакции переноса, присутствуют в мозговой ткани.

18.2.5. Синтез цереброзидов

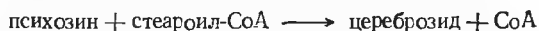
Глюко- и галактоцереброзиды (церамидмоносахариды) образуются при реакции церамида или с UDP-глюкозой, или с UDP-галактозой соответственно. Таким образом,



Сфингенин может реагировать с UDP-галактозой с образованием психозина, β -галактозилцерамида



Реакция катализируется ферментом микросом мозга *галактозилсфингенин-трансферазой*. Психозин, таким образом, является промежуточным продуктом в синтезе цереброзидов. Цереброзиды могут образоваться путем N-ацилирования психозина.



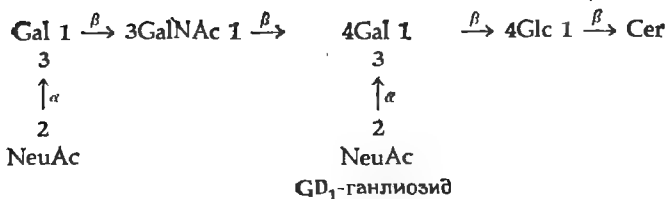
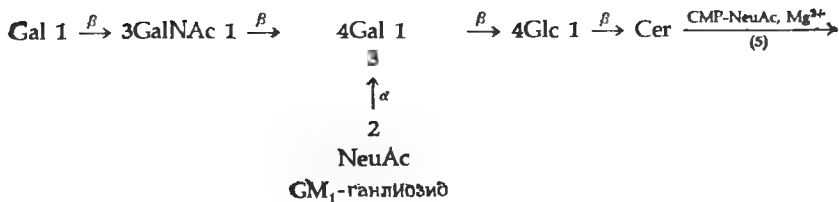
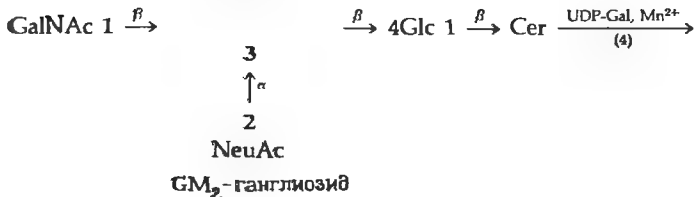
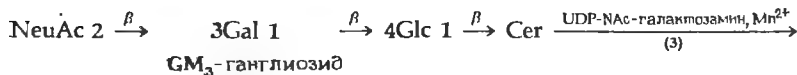
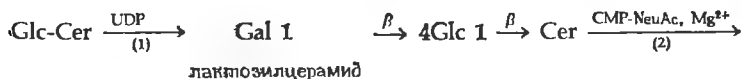
Следовательно, образование цереброзидов может происходить двумя способами, при одном из которых первоначальной реакцией является гликозилирование сфингенина, сопровождаемое N-ацилированием, а при другом — ацилирование сфингенина с образованием церамида предшествует гликозилированию.

Сложные эфиры цереброзидов с серной кислотой, сульфатида-ты (разд. 3.4.1.2), синтезируются с участием галактоцереброзида и 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфата (разд. 20.4.1); реакция катализируется *галактоцереброзид-сульфокиназой* — ферментом микросом мозга. При этом серная кислота этерифицирует 3'-ОН-группу галактозилцерамида.

18.2.6. Синтез ганглиозидов

Значение ганглиозидов обусловлено их особой ролью в функционировании расположенных на плазматической мембране рецепторов для некоторых полипептидных гормонов, например для тиротропина (гл. 48), вирусов и фармакологически активных веществ. Один тип ганглиозидов (GM₁, см. ниже) является рецептором для токсина холеры в кишечнике. Ганглиозиды накапливаются при некоторых заболеваниях, связанных с нарушением депонирования ли-

пидов (см. ниже). Эти гликофинголипиды синтезируются путем последовательных реакций церамидов с углеводсодержащими нуклеотидами с образованием или церамидолигосахаридов, или более сложных ганглиозидов. Основной характерной чертой, отличающей ганглиозиды от цереброзидов, является наличие в молекулах ганглиозидов N-ацетилнейраминовой кислоты, в то время как цереброзиды ее не содержат. Ниже приведены некоторые пути синтеза ганглиозидов (NeuAc — N-ацетилнейраминовая кислота). Ганглиозиды, обозначенные как G, названы в соответствии с количеством сиаловых остатков (N-ацетилнейраминовой кислоты): M — моносиало-; D — дисиало-. Таким образом, название этих ганглиозидов указывает тип соединения, например GM₁-ганглиозид представляет собой соединение типа 1, GD₁-ганглиозид — дисиало-соединение типа 1 и т. д.



Перечисленные реакции катализируются следующими ферментами: реакции (1) и (4) — *гликолипидгалактозил-трансферазами*, реакции (2) и (5) — *гликолипидсиалил-трансферазами*, реакция (3) — *гликолипид-N-ацетилгалактозамин-трансферазами*.

18.2.7. Сфинголипазы и нарушения метаболизма гликосфинголипидов (сфинголипидистрофии)

Как описано в предыдущем разделе, гликосфинголипиды, сульфатиды и сфингомиелины постоянно синтезируются в живом организме и столь же постоянно подвергаются деградации гидролитическими ферментами, присутствующими обычно в лизосомах всех клеток. Таким образом, при нормальных условиях (при обычных обстоятельствах) имеет место равновесная ситуация. В отсутствие или при частичном недостатке одной из специфических гидролаз происходит накопление, особенно в тканях нервной системы, одного или более таких соединений, приводящее к расстройству функций нервной системы, обычно происходящему в первые месяцы жизни и часто приводящему к смерти; исключение в этом смысле составляют форма болезни Гоше у взрослых и болезнь Фабри.

На рис. 18.3 показаны гидролитические пути, приводящие к образованию церамидов. Указаны места действия специфических отсутствующих гидролаз и вызванные в результате нарушения. Каждое из этих расстройств является следствием генетически предопределенного врожденного дефекта.

Сфингомиелиназы ответственны за гидролиз сфингомиелина с образованием церамида и фосфохолина. Эти ферменты обычно присутствуют в больших количествах в селезенке, печени и почках, так же как и в мозге и других тканях. При *болезни Нимана-Пика* у взрослых сфингомиелин накапливается главным образом в селезенке и печени; у детей при этом заболевании наблюдается умственная отсталость и ранняя смерть. Две формы заболевания могут быть обусловлены недостатком одного из двух различных изоферментов.

Специфическая сульфатаза, отсутствующая при *метахроматической лейкодистрофии*, обычно гидролизует сульфатиды до неорганического сульфата и галактозилцерамида; последний гидролизует *галактозилцерамид-β-галактозилгидролазой*, отсутствующей при лейкодистрофии Краббе. Эти лейкодистрофии характеризуются накоплением сульфатидов при первом из упомянутых заболеваний и галактозилцерамида — при втором. Аномально высокие концентрации обоих этих веществ наблюдаются в белом веществе мозга.

Недостаток *гексозаминидазы А* (β -*N*-ацетилгалактозаминидазы) приводит к обычному типу болезни Тея-Сакса, при которой

имеется избыточное количество *ганглиозида Тей-Сакса*, GalNAc-Gal-Glc-Cer, в мозге и селезенке. При редкой форме заболевания Тей-Сакса (болезни Сандхоффа) наблюдается недостаточность как гексозаминидазы А, так и В (см. рис. 18.3).

При одной из форм болезни Гоше, проявляющейся у взрослых, отсутствие β -глюкозидазы приводит к накоплению глюкозилцерамида в ретикулоэндотелиальных клетках, главным образом в печени, селезенке и костном мозге. При детской форме этого заболевания отложение происходит преимущественно в мозге.

При болезни Фабри отсутствует специфическая α -галактозид-

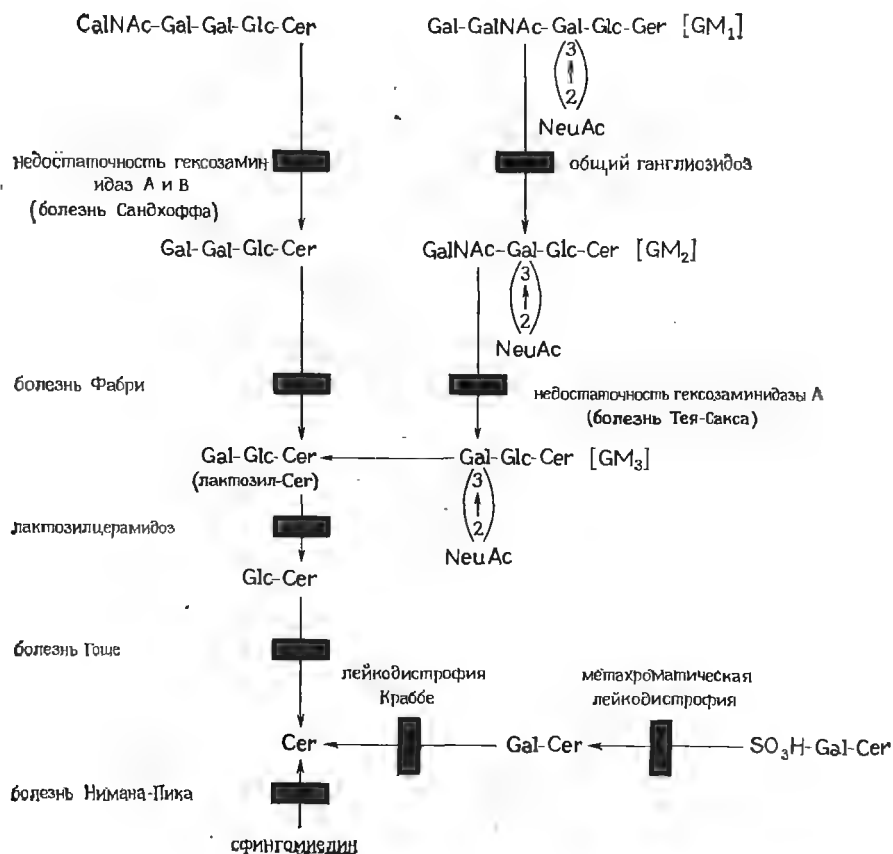


Рис. 18.3. Катаболизм главных гликофинголипидов и сфингомиелина человека. Отсутствие гидролазы при каждом специфическом нарушении обозначено черным прямоугольником. Cer — церамид, Gal — галактозил, Glc — глюкозил, GalNAc — N-ацетилгалактозаминидил, NeuAc — N-ацетилнейраминидил.

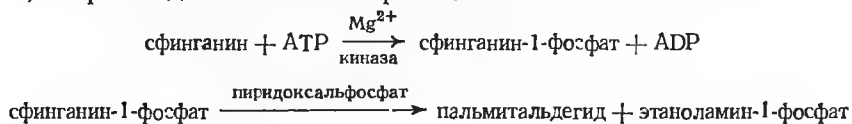
аза. При этом избыточное количество тригексозилцерамида (рис. 18.3) обнаруживается главным образом в почках, но также в кишечнике и лимфе. Происходит быстро прогрессирующее функциональное повреждение почек и других органов.

При *лактозилцерамидозе* отсутствует специфическая β -галактозилгидролаза, что приводит к накоплению лактозилцерамида в мозге, печени, костном мозге и других тканях.

Все указанные нарушения можно распознать путем определения активности соответствующих ферментов в образцах клеток, полученных из амниотической жидкости (путем разреза плодного пузыря). Этот способ позволяет провести диагностические тесты, указывающие на возможность присутствия у плода дефектных генов, ответственных за данные заболевания.

18.2.7.1. Метаболизм сфинганина

Образование сфинганина и его роль в образовании глико-сфинголипидов были описаны ранее. Помимо гидролитических реакций, приводящих к образованию церамидов (рис. 18.3), относительно мало известно о путях расщепления этих соединений. Метаболизм сфинганина происходит в мозге, печени, почках и других тканях. Первоначальной стадией является фосфорилирование, сопровождаемое лизазной реакцией.



В мозге этаноламин (или его фосфат) может служить источником для непосредственного синтеза холина (разд. 18.1.2) или может быть повторно использован для образования фосфатидилэтаноламина (разд. 18.1.2).

18.3. Метаболизм стерина и его контроль

Данная глава будет посвящена в основном метаболизму холестерина — стерина, наиболее часто встречающегося в животных тканях. Другие родственные соединения будут упоминаться лишь эпизодически. Стероидные гормоны будут рассмотрены в гл. 44 и 45.

18.3.1. Источники холестерина организма

18.3.1.1. Пища

Холестерин присутствует во всех животных и некоторых растительных тканях; следовательно, все животные получают этот стерин с пищей. Всасывание его из просвета кишечника улучшается в

присутствии солей желчных кислот; из всех поступающих в организм с пищей стерина только холестерин всасывается в лимфатические сосуды кишечника, а оттуда поступает в грудной проток. При всасывании основная часть его этерифицируется жирными кислотами и появляется в хиломикронах лимфы в виде эфиров холестерина. Всасывание стерина из кишечника было рассмотрено ранее (разд. 17.2.1). Два продукта, образующиеся в кишечнике под действием бактерий из холестерина, а именно 5 α -холестан-3 β -ол (см. ниже) и копростанол (5 β -холестан-3 β -ол) (см. ниже) слабо всасываются из желудочно-кишечного тракта и обнаруживаются преимущественно в кале.

18.3.1.2. Биосинтез холестерина

Все углеродные атомы эндогенного холестерина берут начало из ацетил-СоА. Ферменты синтеза холестерина связаны с цитоплазматическими частицами (микросомами) и водорастворимыми белками плазмы. Однако синтез холестерина зависит от кофактора (или кофакторов), присутствующих в надосадочной жидкости, полученной после осаждения микросом. Первоначальная реакция заключается в образовании 3-окси-3-метилглутарил-СоА; это соединение образуется обычно из 3 молекул ацетил-СоА, как описано выше (разд. 17.10.3).

3-Окси-3-метилглутарил-СоА является непосредственным предшественником *мевалоновой кислоты*, образующейся в реакции, катализируемой NADPH-зависимым сульфгидрилсодержащим ферментом *3-окси-3-метилглутарил-СоА-редуктазой*. Реакция включает восстановление этерифицированной карбоксильной группы оксиметилглутарил-СоА в связанном с ферментом субстрате в две стадии (рис. 18.4); на этом этапе может проявляться действие факторов, интенсифицирующих синтез холестерина (разд. 18.3.2).

В гл. 17 было рассмотрено (разд. 17.10.3) расщепление оксиметилглутарил-СоА до ацетоацетата и ацетил-СоА. Печени голодающих животных, где образуется мало холестерина, свойственна низкая активность оксиметилглутарил-СоА-редуктазы. Это могло бы привести к относительному ускорению реакции расщепления холестерина и, следовательно, к усилению кетогенеза при голодании (разд. 17.10.4).

Биосинтез стерина происходит путем конденсации шести пятиуглеродных единиц, каждая из которых получается из мевалоната. Последовательность реакций между мевалонатом и скваленом (предшественником стерина) показана на рис. 18.4. Мевалоновая кислота фосфорилируется при помощи АТФ в двух последовательных реакциях, катализируемых двумя различными ферментами с последовательным образованием 5-фосфо- и 5-пирофосфомевалоната.

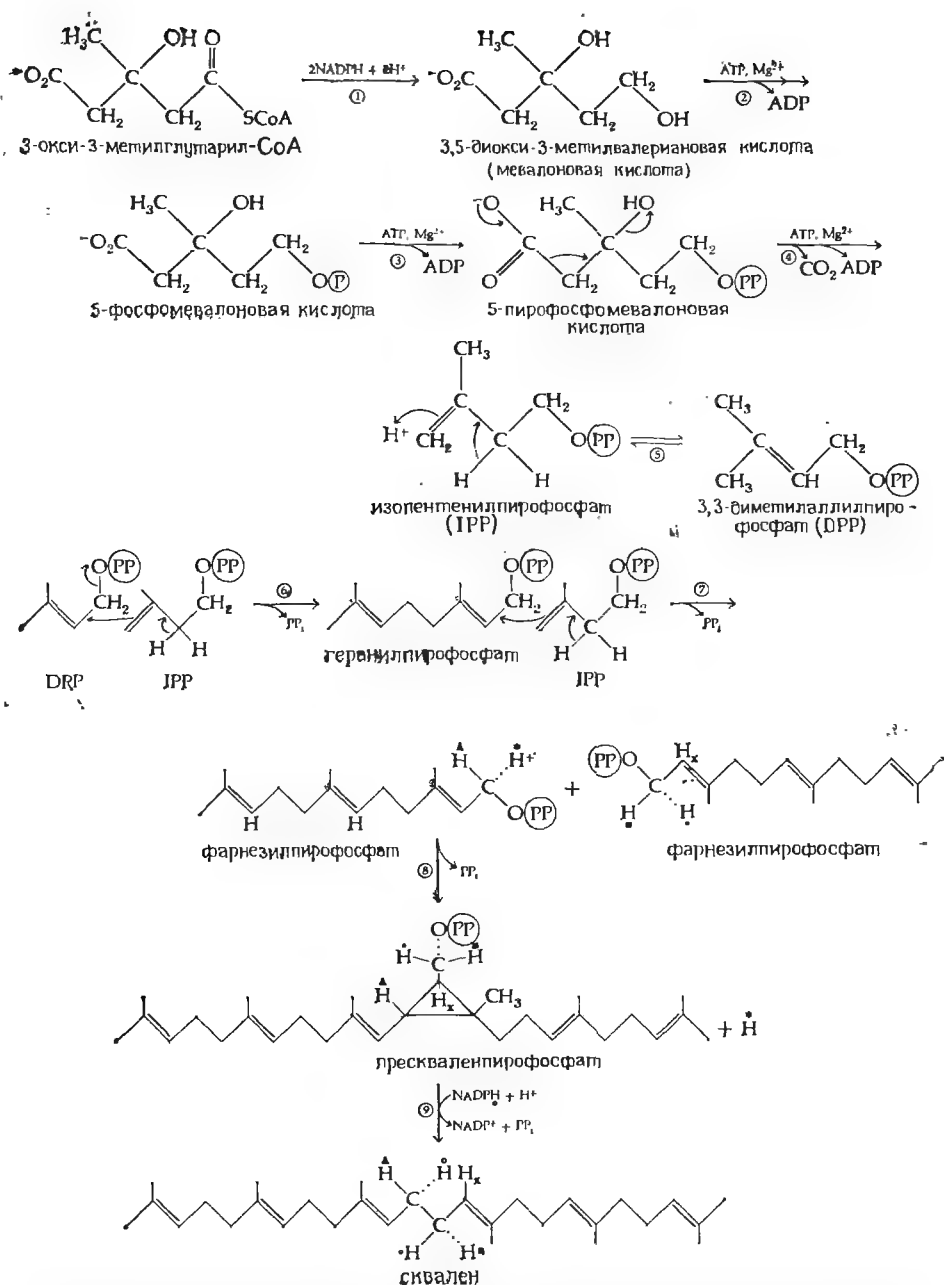


Рис. 18.4. Последовательность реакции от 3-окси-3-метилглутарил-CoA до сквалена. P — фосфат, PP — пирофосфат, IPP — изопентенилпирофосфат, DPP — диметилаллилпирофосфат. Ферменты, катализирующие приведенные выше реакции, обозначены цифрами в кружочках: 1 — 3-окси-3-метилглутарил-CoA-редуктаза; 2 — мевалонаткиназа; 3 — фосфомевалонаткиназа; 4 — пирофосфомевалонат-декарбоксилаза; 5 — изопентенилпирофосфатизомераза; 6 — геранилпирофосфатсинтаза; 7 — фарнезилпирофосфатсинтаза; 8 — прескваленсинтаза; 9 — скваленсинтаза.

Последний при участии АТФ в качестве кофактора превращается в изопентенилпирофосфат путем элиминирования карбоксильной и 3-гидроксидной групп. АТФ, как полагают, действует здесь как нуклеофил, атакуя гидроксидную группу в положении 3, с вытеснением ADP и P_i . Изопентенилпирофосфат быстро изомеризуется в диметилаллилпирофосфат путем присоединения протона к концевой метиленовой углеродной группе, присоединенной двойной связью, с последующим удалением протона от C-2. Эти два изомера являются ключевыми веществами в синтезе полиизопrenoидов и служат основой для последующих реакций, в том числе реакций с образованием углерод-углеродной связи в биосинтезе стероидов. Диметилаллилпирофосфат благодаря наличию двойной связи и этерификации сильной кислотой является электрофильным реагентом, в то время как изопентенилпирофосфат с терминально присоединенной двойной связью метиленовой группой является нуклеофильным реагентом. Эти два соединения, таким образом, идеально подходят для конденсации друг с другом с образованием геранилпирофосфата. Повторение этой реакции между геранилпирофосфатом и другой молекулой изопентенилпирофосфата приводит к образованию фарнезилпирофосфата.

В отсутствие какого-либо кофактора, за исключением Mg^{2+} , две молекулы фарнезилпирофосфата конденсируются микросомальными ферментами до прескваленпирофосфата, что сопровождается потерей одного атома H от C-1 одной из двух молекул фарнезилпирофосфата. Прескваленпирофосфат, который содержит три асимметрических центра при трех углеродных атомах циклопропанового кольца, подвергается перегруппировке и восстанавливается с помощью NADP в качестве кофермента до симметричного C_{30} -терпена — сквалена. Атом H, утраченный в предыдущей реакции, теперь присоединяется путем непосредственного переноса от NADPH.

Сквален переходит в тетрациклическую стероидную конфигурацию в соответствии с последовательностью реакций, приведенных на рис. 18.5. Фермент *сквален-эпоксидаза* катализирует превращение сквалена в 2,3-оксид, при этом используется кислород от «активированного молекулярного кислорода» неизвестной природы. Оксид затем подвергается анаэробной циклизации, катализируемой *скваленоксид-циклазой*, до ланостерина. Эта ферментная система в печени осуществляет исключительно циклизацию скваленоксида до ланостерина. Это указывает на то, что у других форм, включая растения, образование иных тетрациклических тритерпенов и стероидов осуществляется другими циклизующими системами. Установлено, что циклизация сквален-2,3-оксида начинается с атаки протона на оксидное кольцо и сопровождается соответствующими электронными сдвигами, приводящими к замыканиям колец (рис. 18.5) и образованию переходного карбониевого иона при

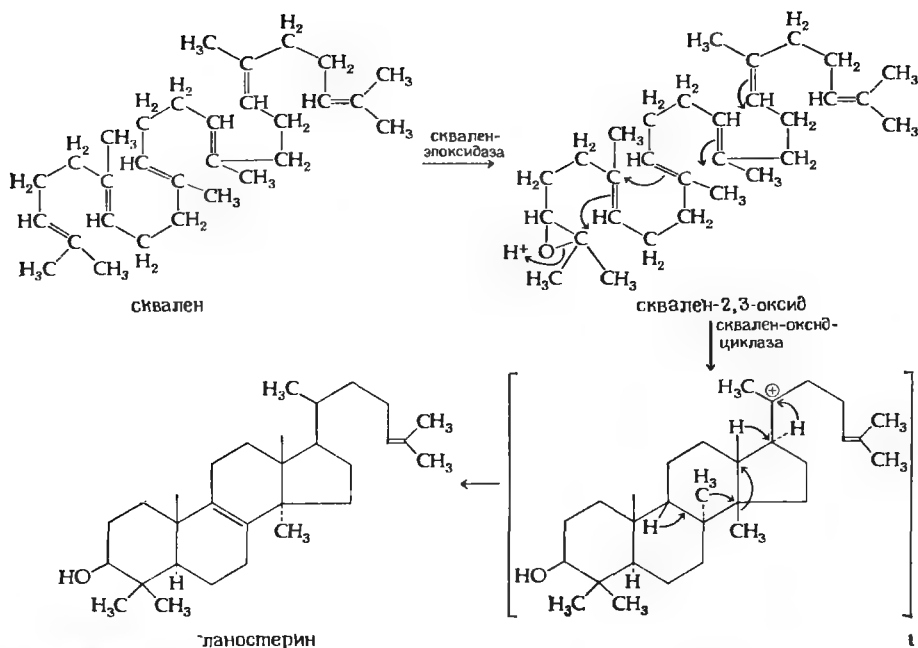


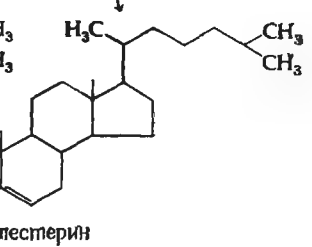
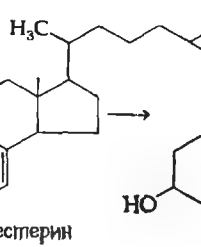
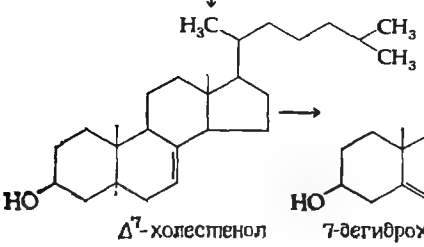
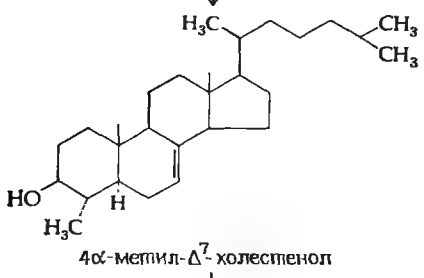
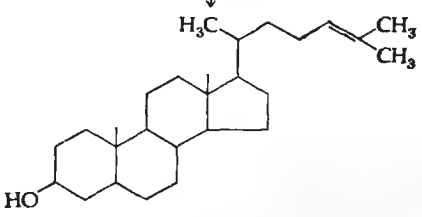
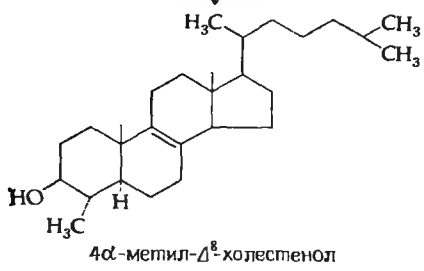
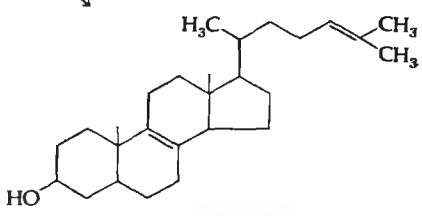
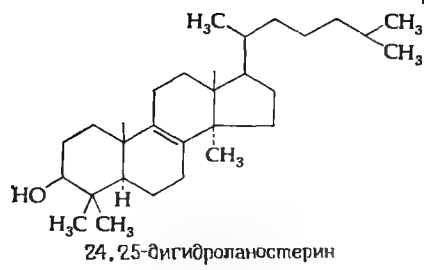
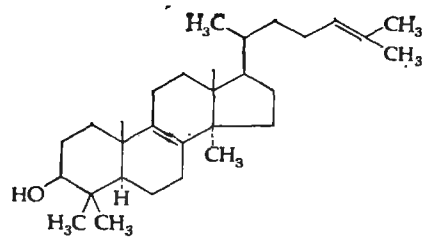
Рис. 18.5. Постулированный механизм превращения скавелеа в ланостерин.

С-20. Ланостерин может быть получен из скавеноксиды путем ряда согласованных перемещений водорода и метильной группы и элиминирования протона из положения С-9.

Превращение ланостерина в холестерин (рис. 18.6) включает удаление трех метильных групп, насыщение двойной связи в боковой цепи и сдвиг двойной связи ланостерина из положения 8,9 в положение 5,6. Насыщение двойной связи, первоначально присутствующей в боковой цепи ланостерина, может происходить на любой стадии превращения ланостерина в холестерин. Так, 24,25-дигидроланостерин всегда присутствует в ланостерине, выделяемом из животных источников. Удаление трех метильных групп является окислительным процессом, так как углеродные атомы появляются в виде CO_2 ; это показывает, что метильные группы в ланостерине, связанные с С-14 и С-4, сначала окисляются до карбоксильных групп и затем удаляются в результате процесса декарбоксилирования.

Рис. 18.6. Два теоретически возможных пути превращения ланостерина в холестерин, предложенные на основе имеющихся данных. Более доказанным можно считать путь через 7-дегидрохолестерин, хотя оба пути, а также и другие возможны.

Промежуточные продукты рассмотрены подробно ранее в этом разделе.



Сначала удаляется метильная группа при С-14, что приводит к образованию или 14-норланоста-8(9),14,24-триен-3 β -ола (из ланостерина), или 14-нор-24,25-дигидрохоланоста-8(9),14-диен-3 β -ола, что связано с удалением не только метильной группы, соединенной с С-14, но также и 15 α -водородного атома.

14,15-Двойная связь в 14-норланостатриеноле и диеноле, вероятно, восстанавливается очень быстро, поскольку эти соединения из природных источников получены не были; синтетические соединения быстро превращаются в холестерин. Удалению 4,4-*гем*-диметильных групп предшествует окисление 3-ОН-группы до кетогруппы; первой удаляется 4 α -метильная группа, что сопровождается восстановлением 3-кетointермедиата до 3- β -ола с одновременной перегруппировкой метильных групп из первоначального 4 β -положения в конфигурацию 4 α .

Последняя реакция иногда может сопровождаться сдвигом двойной связи из положения 8,9 в положение 7,8, чем объясняется факт выделения радиоактивного 4 α -метил- Δ^7 -холестен-3 β -ола из кожи, печени и тонкого кишечника крыс после инъекции ^{14}C -меченого ацетата и присутствие 4 α -метил- Δ^6 -холестен-3 β -ола в опухлях препуциальных желез у мышей.

Удалению остающейся метильной группы в положении С-4 предшествует окисление 3-гидроксильной группы до кетогруппы, причем одновременно или после удаления метильной группы происходит повторное восстановление до 3- β -ола. И в этом случае удаление последней метильной группы может сопровождаться, а может и не сопровождаться сдвигом двойной связи в ядре. Таким образом, находит хорошее объяснение факт обнаружения зимостерина [холеста-8(9),24-диен-3 β -ола], Δ^7 -холестен-3 β -ола и десмостерина (холеста-5,24-диен-3 β -ола) как в качестве естественных продуктов, так и веществ, способных быстро превращаться в холестерин.

Десмостерин или 7-дегидрохолестерин могут служить в качестве прямых предшественников холестерина, причем первый после восстановления 24,25-двойной связи, а последний — при восстановлении 7,8-двойной связи.

Хотя источником всех углеродных атомов холестерина является ацетат, для биосинтеза эргостерина в дрожжах (разд. 3.4.5.3) требуется дополнительный углеродный атом — метильная группа при С-24. Это обеспечивается реакцией метилирования S-аденозилметионином (разд. 21.4.2.10). Установлено, что мевалонат является также источником изопреноидных единиц при биосинтезе каротиноидов (гл. 51) и боковой цепи убихинонов (разд. 12.4) и служит предшественником углеводов каучука.

18.3.1.3. Холестерин жидкостей и тканей организма

Значительная часть холестерина лимфы и плазмы крови находится в липопротеидах. Приблизительно две трети холестерина плазмы этерифицировано жирными кислотами. Образование эфиров холестерина обусловлено в первую очередь действием фермента плазмы — *фосфатидилхолин-холестерин-ацилтрансферазы*, которая катализирует перенос ацила жирной кислоты из положения 2' в фосфатидилхолине к 3-гидроксильной группе в холестерине. Фермент значительно активируется апо-A1 (табл. 17.1).

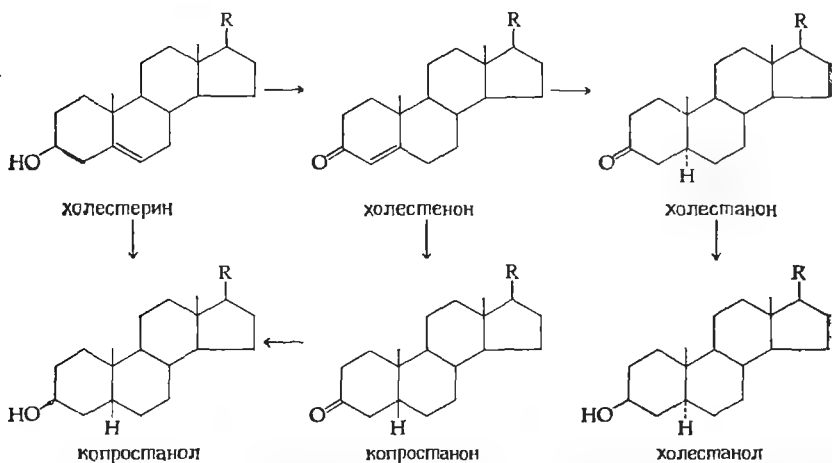
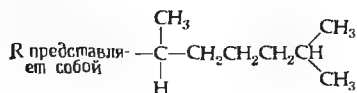
фосфатидилхолин + холестерин $\longrightarrow$ лизофосфатидилхолин + эфир холестерина

Этот фермент, по всей вероятности, ответствен за образование большей части эфиров холестерина, присутствующих в плазме крови, поскольку лица, страдающие недостатком плазменной ацилтрансферазы (редкое врожденное заболевание), почти лишены эфиров холестерина в плазме; для них характерен низкий уровень содержания в плазме лизофосфатидилхолина и повышенный — фосфатидилхолина. У таких людей обнаруживаются только следы α_1 -липопротеидов. Введение таким больным меченого холестерина приводит к появлению в плазме небольших количеств меченых эфиров холестерина, что свидетельствует о некоторой этерификации его во время всасывания в кишечнике. Однако введение меченого мевалоната приводит к появлению только свободного холестерина. Пониженная концентрация эфиров холестерина при болезнях печени может быть обусловлена недостаточным образованием фосфатидилхолина или отсутствием синтеза плазменной фосфатидилхолин-холестерин-ацилтрансферазы, так как фермент образуется в печени. Плазменные эфиры холестерина почти полностью содержат ненасыщенные жирные кислоты, главным образом линолеат, что согласуется с приведенным выше механизмом их синтеза путем переноса остатка жирной кислоты от фосфатидилхолина, который имеет ненасыщенную жирную кислоту и при C-2' (разд. 17.9). Фосфатидилхолин может быть регенерирован из лизофосфатидилхолина повторным ацилированием с помощью CoA-производного ненасыщенной жирной кислоты.

Этерификация холестерина в некоторых тканях может происходить также путем прямого переноса от CoA-производного жирной кислоты.

Печень служит и главным источником холестерина, и основным центром распределения холестерина плазмы, часть которого извлекается из крови, появляясь в желчи. Обычно высокая концентрация холестерина в желчи человека может привести к клиническим последствиям. Несмотря на плохую растворимость в воде, холестерин легко растворяется в водной желчи, которая содержит мицеллы солей желчных кислот и фосфолипидов. В желчном пузыре как вода, так и соли желчных кислот реабсорбируются под влиянием слизистой оболочки желчного пузыря, а если этот процесс продолжается слишком интенсивно, из желчи выпадают кристаллы холестерина. К такой ситуации могут привести либо застой желчи, либо воспалительные процессы в желчном пузыре. Помимо обычных *камней* в желчных протоках обнаруживают плотные образования, состоящие главным образом из кристаллов холестерина; это заболевание называют *желчно-каменной болезнью*. Такие камни в желчном пузыре могут быть незамеченными («молчащими»), но если они перемещаются и закрывают желчные пути, особенно основной проток, это может привести к болям и повышенному уровню желчных пигментов (гл. 32) в сыворотке крови.

Холестерин попадает в кишечный тракт путем выделения через слизистую оболочку кишечника, а также с желчью. В просвете кишечника часть его подвергается микробному восстановлению до копростанола и холестанола по ниже приведенным реакциям и таким образом исключается из процесса реабсорбции. Эти два гидроксилсодержащих стерина вместе с холестерином составляют основную массу стерина кала. Некоторые из этих превращений, например холестенона в холестанол, осуществляются также в печени.



Приблизительно 80% холестерина превращается печеночной тканью в различные желчные кислоты. Количественно холевая и хенодезоксихолевая кислоты являются главными продуктами, образующимися из холестерина. Пути их биосинтеза представлены на рис. 18.7. В этом процессе гидроксирование стероидного ядра холестерина завершается до окончания деградации боковой цепи. Микросомальные гидроксилирующие системы включают цитохром P_{450} и NADPH-цитохром P_{450} -редуктазу (разд. 13.6.6). На рис. 18.7 показаны этапы образования холевой кислоты из холестерина. Сопряжение глицина или таурина с CoA-производными желчных кислот приводит к образованию солей желчных кислот (гл. 34).

Желчные соли, высокие концентрации (0,5—1,5%) которых выводятся с желчью, реабсорбируются слизистой оболочкой тонкого кишечника, поступают в кровь воротной вены печени и таким образом снова возвращаются в печень. От 0,8 до 1,0 г всех желч-

ных кислот теряется ежедневно с калом. Значительная часть желчных кислот, возвращаемая в печень, включается в *энтерогапатическую циркуляцию*. Наряду с хенодезоксихолевой и холевой кислотами в энтерогапатическую циркуляцию включаются также, в ви-

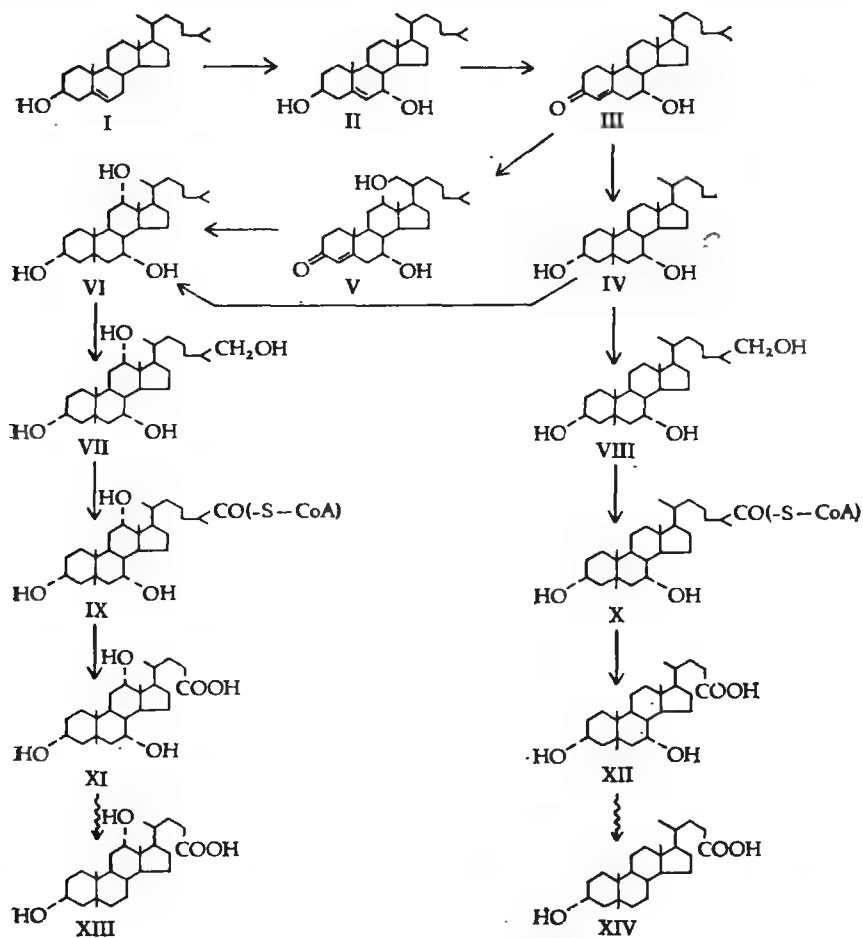


Рис. 18.7. Схема превращения холестерина в желчные кислоты: I — холестерин; II — 7α-оксистерин (5-холестен-3β,7α-диол); III — 7α-окси-4-холестен-3-он; IV — 5β-холестан-3α,7α,12α-триол; V — 7α,12α-диокси-4-холестен-3-он; VI — 5β-холестан-3α,7α,12α-триол; VII — 5β-холестан-3α,7α,12α,26-тетраол; VIII — 5β-холестан-3α,7α,12α-триол; IX — 3α,7α,12α-триокси-5β-холестановая кислота; X — 3α,7α-диокси-5β-холестановая кислота; XI — холевая кислота; XII — хенодезоксихолевая кислота; XIII — дезоксихолевая кислота; XIV — литохолевая кислота. Обычная стрелка представляет реакции, катализируемые ферментами печени; волнистая стрелка — реакции, катализируемые микробными ферментами. (Y. Sjovall, H. Danielsson. *Annu. Rev. Biochem.*, 44, 234, 1975.)

де солей, желчные кислоты дезоксихолевая и литохолевая, которые производятся микробными ферментами в кишечнике. Более подробное обсуждение свойств желчных кислот будет представлено в гл. 34.

18.3.1.4. Другие продукты метаболизма холестерина

Холестерин является источником стероидных гормонов в половых железах и коре надпочечников. Пути их биосинтеза представлены в гл. 44 и 45.

При всасывании холестерина часть его подвергается дегидрированию до 7-дегидрохолестерина в слизистой оболочке кишечника. Это превращение осуществляется также в коже и в других тканях. В коже накапливается запас 7-дегидрохолестерина и содержится больше сквалена, чем холестерина. 7-Дегидрохолестерин может служить предшественником витамина D (гл. 51).

18.3.2. Регуляция метаболизма холестерина

В регуляции метаболизма холестерина, основного стерина млекопитающих, играет роль несколько факторов. Все они осуществляют свое влияние путем изменения скорости синтеза или распада холестерина.

Основным местом синтеза холестерина является печень, хотя другие ткани, например кишечник, надпочечники, кожа, нервная ткань, аорта и репродуктивные органы, также синтезируют этот стерин. Во всех тканях, за исключением нервной, холестерин находится в состоянии непрерывного обмена. Однако в одних и тех же тканях, например в надпочечниках, могут существовать и относительно небольшие быстро обменивающиеся пулы и несколько большие инертные, резервные пулы.

Основная регуляция синтеза холестерина осуществляется на пусковой стадии его образования, а именно при восстановлении 3-окси-3-метилглутарил-СоА (ОМГ-СоА) в мевалоновую кислоту, катализируемую *ОМГ-СоА-редуктазой* (разд. 18.3.1).

Подходящей моделью для исследования регуляции метаболизма холестерина оказалась культура фибробластов человека. Эти клетки обладают специфическими рецепторами на клеточной поверхности, связывающими липопротеиды низкой плотности (ЛПНП) — основной носитель холестерина в плазме. Последовательность происходящих при этом процессов такова: 1) связывание ЛПНП с рецептором; 2) внедрение в клетку связанного с рецептором ЛПНП посредством эндоцитоза и доставка его к лизосомам; 3) деградация лизосомами, приводящая к гидролизу как эфиров холестерина (главным образом холестериллинолеата), так и

апопротеинов ЛПНП (в основном апо-В); 4) возвращение освобожденных аминокислот в пул и вхождение холестерина в клеточные мембраны и 5) подавление аккумулированным в клетке холестерином его биосинтеза, начиная с подавления активности ОМГ-СоА-редуктазы, как отмечено выше.

Присутствие рецепторов для ЛПНП было установлено только в фибробластах в культуре и еще нуждается в подтверждении для тканей печени и слизистой оболочки кишечника — основных мест биосинтеза холестерина. Однако существенная роль ЛПНП плазмы и значение их в метаболизме холестерина выявляются при изучении генетических нарушений, при которых в плазме или совсем нет ЛПНП, или они присутствуют в недостаточном количестве. При *абеталипопротеинемии* (разд. 18.4.3) характеризующейся недостаточностью в плазме апо-В и ЛПНП, в свежих срезах кожи скорость синтеза холестерина у лиц, страдающих этим заболеванием, может быть даже в пять раз выше, чем в норме, но вместе с тем у таких больных отмечается очень низкий уровень холестерина плазмы, вследствие чего он недоступен для клеток тела.

18.3.2.1. Пища и метаболизм холестерина

Как голодание, так и кормление пищей с избытком холестерина заметно снижает активность ОМГ-СоА-редуктазы в печени. Это обусловлено механизмом контроля синтеза холестерина по типу обратной связи, так как и синтез, и активность этого фермента ингибируются холестерином. Ферментативная активность повышается по окончании периода голодания. Диета с повышенным содержанием углеводов или триацилглицеринов стимулирует синтез холестерина из ацетил-СоА.

Имеются данные, что кормление холестерином наряду с ограничением образования мевалоновой кислоты ингибирует также превращение в холестерин введенной мевалоновой кислоты. Вторым локусом воздействия холестерина пищи по типу обратной связи является циклизация сквалена в ланостерин.

Изменения в уровне холестерина плазмы наблюдались в ответ на изменения в степени насыщенности жирных кислот пищи (гл. 49). Чем более насыщены жирные кислоты пищи, тем выше концентрация холестерина в сыворотке. Причина этого неизвестна.

Печень играет основную роль в деградации холестерина (см. выше). Скорость превращения холестерина в его метаболиты, в том числе желчные кислоты, влияет на уровень выделения холестерина печенью в желчь и, следовательно, на количество холестерина, всасываемое из кишечника. Таким образом, этот холестерин, так же как и холестерин пищевого происхождения, может влиять на скорость синтеза холестерина.

18.3.2.2. Патологии в накоплении холестерина

Образование холестериновых камней в желчном протоке было описано выше. Патологическое отложение бляшек, содержащих холестерин в интиме аорты, является характерным для атеросклеротического поражения. Механизм этого отложения у человека еще не ясен, однако при этом отмечены сопутствующие изменения в составе крови. Хотя концентрация холестерина в плазме может быть не слишком высокой, отношение количеств холестерина и фосфолипидов повышается, одновременно возрастает фракция липопротендов S_f от 12 до 20 (разд. 17.4), богатая холестерином, и повышается уровень триацилглицеринов.

В связи с тем что избыточное отложение холестерина в сосудистой ткани может привести к нежелательным последствиям, предпринимались попытки снизить уровень холестерина в крови в надежде на уменьшение отложения холестерина в сосудах. При этих попытках использовали ряд терапевтических и диетологических мероприятий. Ранее упоминалось некоторое предпочтительное влияние ненасыщенных липидов диеты — по сравнению с насыщенными — на уровень холестерина в крови. Влияние липидов диеты на возникновение атеросклероза рассмотрено более подробно в гл. 49. Лекарственная терапия, направленная на снижение биосинтеза эндогенного холестерина, не дала практического успеха. Некоторые лекарства, которые снижают образование холестерина, приводят к накоплению промежуточных продуктов синтеза холестерина, в том числе десмостерина, в печени и в интиме крупных кровеносных сосудов. Причина гипохолестеринемии в случаях стимуляции функций щитовидной железы (гипертириоз) не ясна, однако сам факт снижения содержания холестерина в крови побудил исследовать подобные гормоны щитовидной железы — вещества, которые могут снижать уровень холестерина крови, не проявляя других эффектов гормонов щитовидной железы (гл. 42). Более низкая заболеваемость атеросклерозом у женщин по сравнению с мужчинами и снижение уровня холестерина под влиянием женских половых гормонов также стимулировали поиск соединений, которые напоминают по своему действию на уровень холестерина крови женские половые гормоны, но при этом вызывают минимальные гормональные эффекты (гл. 44). Другие профилактические подходы для предотвращения атеросклероза были направлены на поиски диеты или лекарств для уменьшения уровня триацилглицеринов крови.

На синтез и деградацию холестерина влияют некоторые гормоны, рассмотренные в пятой части этой книги.

Наследственная гиперхолестеринемия представляет собой генетически врожденное нарушение, гетерозиготная или гомозиготная форма которого сопровождаются высоким уровнем в плазме хо-

лестерина и ЛПНП и приводят к раннему атеросклерозу. Было показано, что фибробласты таких людей не имеют рецепторов для ЛПНП плазмы (разд. 17.3). Вследствие этого нарушено поступление эфиров холестерина в клетку и отсутствует внутриклеточная регуляция (по типу обратной связи) ОМГ-редуктазы, которая должна была бы проявляться при повышенных концентрациях внутриклеточного холестерина (см. выше). Это приводит к нерегулируемой высокой скорости синтеза холестерина, создавая основу для гиперхолестеринемии. Однако, как указывалось выше, эти данные основаны на изучении тканевых культур фибробластов, полученных при биопсии кожи при этом заболевании, а не в опытах с клетками печени, которая является основным местом биосинтеза холестерина и снабжения им крови.

Среди населения Соединенных Штатов почти у 1% наблюдается гетерозиготная наследственная гиперхолестеринемия, причем показано, что у таких людей развивается ранний атеросклероз (до 50 лет) и его последствия, например закупорка коронарных артерий. Гомозиготное состояние является серьезным заболеванием и приводит к смерти до двадцати лет. У людей с гетерозиготной и особенно с гомозиготной формами наследственной гиперхолестеринемии наблюдается *ксантоматоз*, характеризующийся многочисленными доброкачественными жировыми опухолями (*ксантомы*) кожи, сухожилий и костей.

Нарушение образования тканевых резервов эфиров холестерина и синдром Вольмана связаны с недостаточностью кислой липазы лизосом, которая обычно гидролизует эфиры холестерина, поступающие с ЛПНП. Эфиры холестерина накапливаются в лизосомах во многих тканях тела.

Реже появляется синдром *Шюллера-Христиана*, характеризующийся ксантоматозными отложениями в плоских костях черепа, печени и селезенке, связанными с диабетом.

При некоторых других заболеваниях человека наблюдаются изменения содержания холестерина в плазме крови без явного отложения холестерина в тканях. Липемия и особенно гиперхолестеринемия встречаются при гипотиреозе (гл. 42), так же как и при нефротическом синдроме. Ни в одном из этих случаев не понятна значимость биохимических нарушений. Гиперхолестеринемия может быть вызвана повышением содержания в крови некоторых адренокортикостероидов (гл. 45), так же как и некоторых продуктов секреции гипофиза (гл. 48).

18.4. Другие нарушения метаболизма липидов

Нормальное протекание процессов метаболизма липидов сопровождается одновременно протекающими процессами синтеза и отложения, мобилизации и распада липидов организма — эти про-

цессы характеризуют биологическое динамически устойчивое состояние. В организме здорового взрослого человека количество липидов тела практически постоянно в течение длительных периодов времени. Описаны нарушения метаболизма, которые заключаются в дисбалансе между процессами, приводящими к синтезу и депонированию липидов, и процессами мобилизации липидов в местах отложения.

18.4.1. Тучность

Сумма всех потребностей млекопитающего в калориях, в том числе запасы энергии плюс затраты калорий на мышечную и другие формы работы, а также обеспечение внутренней динамики организма, обычно соотносятся с потреблением пищи. Если пищевой рацион дает избыток калорий, разница будет появляться в виде жировых депо. При прочих равных условиях можно ожидать, что избыток в 9 ккал должен привести к отложению приблизительно 1 г дополнительного жира.

Хотя наиболее общей причиной тучности является переедание, следует рассмотреть и другие факторы. Отклонения в скоростях основных метаболических процессов, смена образа жизни с активного на сидячий при отсутствии компенсирующего снижения потребления пищи будут приводить к увеличению жировой ткани. Повреждение в эксперименте определенных областей гипоталамуса приводит к выраженной полифагии, которая, если она не ограничена, может привести к необычной полноте. Отравление некоторыми солями золота и сульфаниламидами также приводит к тучности. У мышей наследственная полнота передается как доминантный признак по Менделю. Синтетаза жирных кислот в печени таких мышей обладает более высоким, чем у обычных мышей, уровнем активности. Объяснить это явление пока что не удастся.

Тучность является общим показателем историй болезни людей, страдающих диабетом, и рассматривается как фактор, предрасполагающий к этому и другим заболеваниям. Тучность значительно снижает среднюю продолжительность жизни у более старых возрастных групп.

Ограничение потребления калорий ниже общей потребности в калориях неизбежно ведет к потере липидов тела, хотя вследствие того, что меняется количество удерживаемой воды это может не сразу отразиться на изменении веса тела.

18.4.2. Кахексия

Недостаточное потребление калорий может привести и к полному исчезновению жировой ткани из подкожного и сальникового депо. Это может происходить при опухолях или хроническом инфекционном заболевании, при недостаточном питании или при ме-

табolicеских нарушениях, таких, как диабет или увеличение щитовидной железы. В экспериментах было показано, что повреждение определенных областей гипоталамуса вызывает анорексию даже у предварительно голодавшего животного. Для анорексии, в происхождении которой имеет значение психогенный компонент, используют термин «*apogexia nervosa*».

В то время как потеря липидов тела при болезни щитовидной железы связана частично с избыточной мобилизацией резервных липидов, существенной причиной кахексии при голодании, недостаточности тиамина или диабете является сниженная способность организма синтезировать жирные кислоты из углеводных предшественников.

18.4.3. Абетаалипопротеинемия

Это относительно редкое генетическое заболевание характеризуется отсутствием в плазме β -липопротеидов плотности, меньшей чем 1,063 и связано с интенсивной демиелинизацией нервных волокон. Апо-В отсутствует в плазме, так же как и в хиломикронах, НППОЛ и ЛПНП. Уровень триацилглицеринов и холестерина плазмы очень низок. Это свидетельствует о необходимости апо-В для нормального всасывания, синтеза и транспорта триацилглицеринов и холестерина из кишечника и печени. Липиды накапливаются в клетках слизистой оболочки кишечных ворсинок, при этом наблюдается *акантоцитоз* — сферическая деформация эритроцитов. Более 80% эритроцитов являются акантоцитами, или, как их иначе называют, зубчатыми эритроцитами (по-гречески *akantha* означает зубец, шип).

18.4.4. Болезнь Танжера или наследственная недостаточность липопротеидов высокой плотности

Это редкое генетическое нарушение характеризуется почти полным отсутствием липопротеидов высокой плотности в плазме наряду с избыточным отложением эфиров холестерина во многих тканях. При этом заболевании заметно снижен уровень холестерина плазмы, концентрация фосфолипидов в крови также понижена, однако уровень триацилглицеринов или находится в норме или повышен. Заболевание проявляется в отсутствие апо-А1, основного белкового компонента ЛПВП и ЛПОВП.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

- Ansell G. B., Hawthorne J. N., Dawson R. M. C., eds., *Form and Function of Phospholipids*, 2d ed., Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, London, New York, 1973.

- Greenberg D. M.*, ed., *Metabolic Pathways*, vol. II, «Lipids, Steroids and Carotenoids», 3d ed., Academic Press, Inc., New York, 1968.
- Holmes W. L., Paoletti R., Kritchevsky D.*, eds., *Pharmacological Control of Lipid Metabolism*, Plenum Press, New York, 1972.
- Mead J. F., Fulco A. J.*, *The Unsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids in Health and Disease*, Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Ill., 1976.
- Popjak G., Grant J. K.*, eds., *The Control of Lipid Metabolism*, Academic Press, Inc., New York, 1963.
- Renold A. E., Cahill G. F., Jr.*, eds., *Handbook of Physiology*, sec. 5, *Adipose Tissue*, American Physiological Society, Washington, D. C., 1965.
- Richards J. H., Hendrickson J. B.*, *Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins*, W. A. Benjamin, Inc., New York, 1964.
- Rommel K., Bohmer R.*, eds., *Lipid Absorption: Biochemical and Clinical Aspects*, University Park Press, Baltimore, 1976.
- Schettler G.*, ed., *Lipids and Lipidoses*, Springer-Verlag OHG, Berlin, 1967.
- Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S.*, eds., *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 3d ed., McGraw-Hill Book Company, New York, 1972. (See pt. IV, Disorders Characterized by Evidence of Abnormal Lipid Metabolism, and chap. 22, Disorders of Propionate Methylmalonate, and Vitamin B₁₂ Metabolism.)
- Sweeley C. C.*, ed., *Chemistry and Metabolism of Sphingolipids*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1970.
- Taylor W.*, ed., *The Hepatobiliary System*, Plenum Press, New York, 1976.
- Volk B., Aronson S. M.*, eds., *Sphingolipids, Sphingolipidoses, and Allied Disorders*, Plenum Press, New York, 1972.
- Wakil S.*, eds., *Lipid Metabolism*, Academic Press, Inc., New York, 1970.
- Wiegandt H.*, *Chemistry and Metabolism of Sphingolipids*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1969.
- Wolf G.*, ed., *Recent Research on Carnitine: Its Relation to Lipid Metabolism*, The M. I. T. Press, Cambridge, Mass., 1965.

Обзорные статьи

- Björntorp P., Östman J.*, *Human Adipose Tissue: Dynamics and Regulation*, *Adv. Metabol. Disord.*, **5**, 277—327, 1971.
- Bloch K.*, *The Biological Synthesis of Cholesterol*, *Science*, **150**, 19—23, 1965.
- Bloch K., Vance D.*, *Control Mechanisms in the Synthesis of Saturated Fatty Acids*, *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 263—298, 1977.
- Brown M. S., Goldstein J. L.*, *Receptor-mediated Control of Cholesterol Metabolism*, *Science*, **191**, 150—154, 1976.
- Danielsson H., Sjövall J.*, *Bile Acid Metabolism*, *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 233—253, 1975.
- Dugan R. E., Porter J. W.*, *Hormonal Regulation of Cholesterol Synthesis*, pp. 197—247, in: G. Litwack, ed., «*Biochemical Actions of Hormones*». vol. 4, Academic Press, New York, 1977.
- Eisenberg S., Levy R. I.*, *Lipoprotein Metabolism*, *Adv. Lipid Res.*, **13**, 1—89, 1975.
- Fulco A. J.*, *Metabolic Alterations of Fatty Acids*, *Annu. Rev. Biochem.*, **43**, 147—168, 1974.
- Goldstein J. L., Brown M. S.*, *The Low Density Lipoprotein Pathway and Its Relation to Atherosclerosis*, *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 897—910, 1977.
- Hoffmann A. F., Small D. M.*, *Detergent Properties of Bile Salts: Correlation with Physiological Function*, *Annu. Rev. Med.*, **18**, 333—376, 1967.
- Hollenberg C. H., Vost A., Patten R. L.*, *Regulation of Adipose Mass: Control of Fat Cell Development and Lipid Content*, *Recent Prog. Hormone Res.*, **26**, 463—503, 1970.
- Jackson R. L., Morrisett J. D., Gotto A. M., Jr.*, *Lipoprotein Structure and Metabolism*, *Physiol. Rev.*, **56**, 259—316, 1976.

- Krebs H. A.*, The Regulation of Release of Ketone Bodies by the Liver, *Adv. Enzyme React.*, **4**, 339—354, 1966.
- Lynen F.*, The Role of Biotin-dependent Carboxylations in Biosynthetic Reactions, *Biochem. J.*, **102**, 382—400, 1967.
- Masoro E. J.*, Lipids and Lipid Metabolism, *Annu. Rev. Physiol.*, **39**, 301—321, 1977.
- McMurray W. C.*, *Magee W. L.*, Phospholipid Metabolism, *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 129—169, 1972.
- McNamara D. J.*, *Rodwell V. W.*, Regulation of «Active Isoprene» Biosynthesis, pp. 205—243, in: E. Kun and S. Grisolia, eds., «Biochemical Regulatory Mechanisms in Eukaryotic Cells», Wiley-Interscience, New York, 1972.
- Morrisett J. D.*, *Jackson R. L.*, *Goffo A. M., Jr.*, Lipoproteins: Structure and Function, *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 183—207, 1975.
- Numa S.*, *Yamashita S.*, Regulation of Lipogenesis in Animal Tissues, *Curr. Top. Cell Regul.*, **8**, 197—246, 1975.
- Paoletti R.*, *Sirtori C. R.*, Control Mechanisms in Lipid Mobilization and Transport, pp. 491—513, in: E. Kun and S. Grisolia, eds., «Biochemical Regulatory Mechanisms in Eukaryotic Cells», Wiley-Interscience, New York, 1972.
- Ramasarma T.*, Control of Biogenesis of Isoprenoid Compounds in Animals, *Current Topics Cell Regul.*, **6**, 169—207, 1972.
- Scanu A. M.*, *Wisdom C.*, Serum Lipoproteins: Structure and Function, *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 703—730, 1972.
- Senior J. R.*, Intestinal Absorption of Fats, *J. Lipid Res.*, **5**, 495—521, 1964.
- Siperstein M. D.*, Regulation of Cholesterol Biosynthesis in Normal and Malignant Tissues, *Current Topics Cell Regul.*, **2**, 65—100, 1970.
- Stoffel W.*, Sphingolipids, *Annu. Rev. Biochem.*, **40**, 57—82, 1971.
- Van den Bosch H.*, Phosphoglyceride Metabolism, *Annu. Rev. Biochem.*, **43**, 243—277, 1974.
- Volpe J. J.*, *Vagelos, P. R.*, Mechanisms and Regulation of Biosynthesis of Saturated Fatty Acids, *Physiol. Rev.*, **56**, 339—417, 1976.
- Wiegand H.*, Glycosphingolipids, *Adv. Lipid Res.*, **9**, 249—289, 1971.

Глава 19

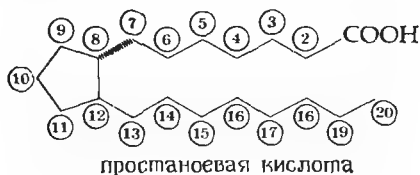
МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ. III

Простагландины

Простагландины — это жирные кислоты C_{20} , содержащие циклопентановое кольцо; они встречаются, в сущности, во всех тканях млекопитающих и обладают многочисленным и разнообразным биологическим действием. В этой главе будут изложены химические свойства, биосинтез, метаболизм и биологические функции простагландинов. Эти вещества были названы так после обнаружения их в предстательной железе, которую вначале считали единственным местом их образования.

19.1. Химические свойства

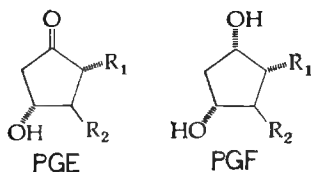
Простагландины PG можно рассматривать как производные гипотетической C_{20} -кислоты, получившей тривиальное название *простаноевой*. В углеродном скелете, представленном ниже, не показаны атомы водорода:



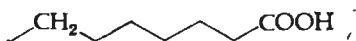
Так, например, PGE_1 (см. ниже) в соответствии с систематической номенклатурой представляет собой 11,15-диокси-9-кетопрост-13-*транс*-еновую кислоту.

Имеются две основные группы простагландинов E и F серий, каждая из которых включает три члена — E_1 , E_2 и E_3 и $F_{1\alpha}$, $F_{2\alpha}$ и $F_{3\alpha}$. Эти простагландины являются первичными простаггандинами. Указанные две серии простагландинов отличаются друг от друга тем, что PGE содержат кетогруппу при C-9 и гидроксидную груп-

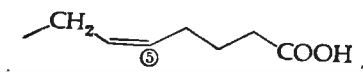
пу при С-11, в то время как PGF имеют гидроксидную группу в обоих положениях в цикlopentanовом кольце.



Индексы PG 1, 2 и 3 в каждой серии указывают на число двойных связей в боковых цепях R_1 и R_2 . Так, R_1 в PGE_1 и $PGF_{1\alpha}$ являются насыщенными, как, например в протаноевой кислоте:



В PGE_2 , PGE_3 , $PGF_{2\alpha}$ и $PGF_{3\alpha}$ боковая цепь R_1 содержит *цис*-двойную связь в положении 5:



R_2 в PGE_1 , E_2 , $F_{1\alpha}$ и $F_{2\alpha}$ содержит гидроксидную группу при С-15 в α - (или S-) конфигурации и *транс*-двойную связь в положении 13. В PGE_3 и $PGF_{3\alpha}$ R_2 имеет дополнительную *цис*-двойную связь в положении 17.

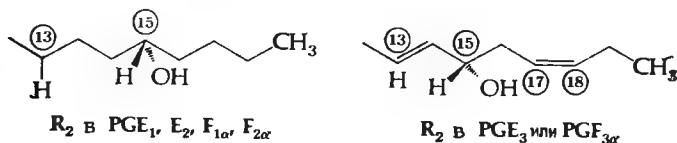


Рис. 19.1 показывает структуру шести первичных простагландинов; как указано выше, простагландины серии E отличаются по структуре от простагландинов серии F только природой заместителя при С-9 в цикlopentanовом кольце.

Обозначение α и β после цифровых индексов в структуре простагландинов серии F указывает ориентацию гидроксидной группы при С-9 таким же образом, как и в сериях стероидов (разд. 58); так, α обозначает положение ОН-группы ниже, а β — выше плоскости проекции цикlopentanового кольца, как видно на рис. 19.1.

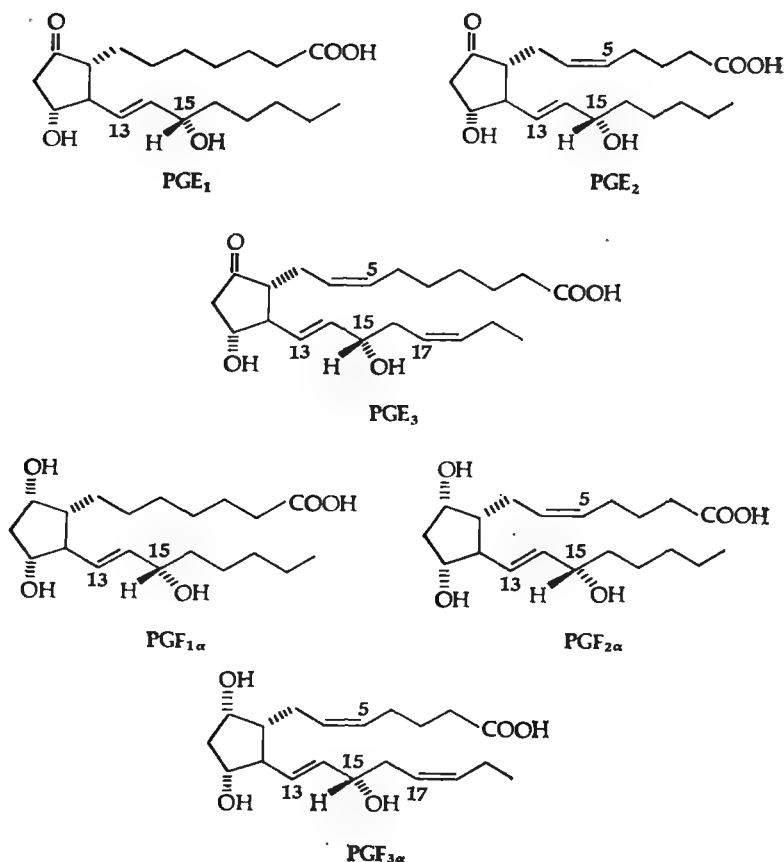


Рис. 19.1. Шесть главных природных простагландинов.

Все природные PGF имеют α -конфигурацию при C-9; PGF _{β} вместе с некоторыми PGF _{α} образуются из PGE при восстановлении боргидридом натрия.

В дополнение к вышеприведенным шести первичным простагландинам имеются несколько вторичных простагландинов, большинство из которых являются продуктами ферментативного (см. ниже) или химического превращения PGE. Характерным свойством простагландинов серии Е является их способность к дегидратации в PGA в кислой среде; образовавшиеся PGA затем в присутствии оснований изомеризуются в PGВ, имеющие максимум поглощения при длине волны 237 нм. Эта последовательность реакций превращения PGE в PGВ часто используется для идентификации

ственно 0,2 и 1,3% воздушно-сухой массы этого коралла. Гомогенаты *P. homomalla* катализируют превращение арахидоновой кислоты — предшественника в биосинтезе простагландинов — в PGA_2 .

Получено уже много синтетических аналогов простагландинов. Вследствие широкого биологического действия простагландинов (разд. 19.4) большое значение приобретают интенсивные исследования факторов, контролирующих биосинтез этих соединений, ингибиторов отдельных реакций синтеза, а также возможностей практического использования различных аналогов простагландинов.

Помимо простагландинов E_2 , $\text{F}_{2\alpha}$ и простациклина (PGI_2), показанных на рис. 19.2, в качестве промежуточных продуктов биосинтеза простагландинов образуются эндопероксиды простагландинов [серии PGG и PGH (рис. 19.2)]. Эндопероксиды также служат предшественниками тромбосанов (см. ниже). Название последних указывает на то, что они впервые выделены из тромбоцитов или, как их еще называют, кровяных пластинок и что они включают в свою структуру кислородсодержащее кольцо.

Тромбосан A_2 и PGI_2 являются сильными клеточными регуляторными агентами с активностью, значительно превышающей активность простагландинов по силе влияния на агрегацию тромбоцитов (разд. 19.4.3); тромбосан B_2 неактивен. Эндопероксиды PGI_2 и тромбосаны были обнаружены только недавно в связи с тем, что они имеют очень короткий период полупревращения в водных растворах: около 5 мин для эндопероксидов простагландинов, от 10 до 15 мин для PGI и 30 с для тромбосана.

19.2. Биосинтез

Простагландины с одной, двумя или тремя двойными связями в боковых цепях, как серии E , так и серии F , образуются из эйкоза-8,11,14-триеновой, эйкоза-5,8,11,14-тетраеновой (арахидоновой) и эйкоза-5,8,11,14,17-пентаеновой кислот соответственно. Первичные простагландины содержат на две двойные связи меньше в сравнении с жирными кислотами — их предшественниками в биосинтезе. Так, эйкозатриеновая кислота является предшественником PGE_1 и $\text{PGF}_{1\alpha}$, арахидоновая кислота — PGE_2 и $\text{PGF}_{2\alpha}$, а эйкозапентаеновая кислота — PGE_3 и $\text{PGF}_{3\alpha}$.

Весь путь биосинтеза простагландинов был выяснен при использовании гомогенатов различных тканей, таких, например, как ткани предстательной железы барана, легких и печени морской свинки, а также тромбоцитов человека в качестве источников ферментных систем и обычно арахидоновой кислоты как субстрата. Поскольку арахидоновая кислота составляет большую часть C_{20} -полиеновых жирных кислот в липидах многих тканей, не вызывает

удивления то обстоятельство, что PGE_2 и $\text{PGF}_{2\alpha}$ являются двумя наиболее распространенными простагландинами. Внутривенное введение натриевой соли арахидоновой кислоты животным различных видов приводит к быстрому проявлению биологического действия простагландинов, например ускорению агрегации тромбоцитов (разд. 19.4.3), образованию внутрисосудистых тромбов и усилению желудочно-кишечной моторики (разд. 19.4.4 и далее).

C_{20} -три-, тетра- и пентаеновая жирные кислоты, служащие предшественниками простагландинов, входят в состав внутриклеточных фосфоглицеридов, из которых они высвобождаются под действием фосфолипазы A_2 (разд. 18.1.3). Этот процесс высвобождения предшественника, вероятно, играет роль регулирующей стадии в биосинтезе простагландинов, с помощью которой варьирует количество субстрата, подвергающегося последующему действию *простагландинсинтазы*. Последняя представляет собой связанный в мембране мультиферментный комплекс, содержащийся в микросомальной фракции тканевых гомогенатов. Необходимо отметить, что ингибиторное действие кортикостероидов на биосинтез простагландинов, связанное с торможением активности фосфолипазы A_2 , может служить объяснением противовоспалительного действия этих стероидных гормонов (гл. 45).

Биосинтез PGE_2 и $\text{PGF}_{2\alpha}$, представленный на рис. 19.2, начинается с арахидоновой кислоты и катализируется *циклооксигеназой* жирных кислот, входящей в состав ферментов простагландинсинтазного комплекса; при этом образуется 15-оксиперокси-9-11-эндопероксид PGG_2 . Первая стадия в этой последовательности реакций приводит к потере атома водорода ($\text{H}\cdot$) у C-13 с образованием свободного радикала. Эта стадия лимитирует скорость всего процесса. Затем происходят присоединение пероксидного радикала в положения 9 и 11 и образование 8,12 углерод-углеродной связи, которому предшествует изомеризация 11,12-двойной связи в 12,13-двойную связь и присоединение другого пероксидного радикала в положение 15, приводящее к изомеризации 12,13-двойной связи в 13,14-двойную связь. Все эти превращения рассматриваются как процесс одноэлектронного переноса, обозначенный на рисунке изогнутыми наподобие рыбного крючка стрелками. Первый продукт этой последовательности реакций — это 15-оксиперокси-9,11-эндопероксид PGG_2 , существование которого было постулировано за несколько лет до его выделения и идентификации. PGG_2 затем превращается в PGI_2 или PGH_2 , вероятно, с помощью реакции пероксидазного типа. PGH_2 является предшественником PGE_2 и $\text{PGF}_{2\alpha}$ в семенных пузырьках и других органах, а также тромбоцитах A_2 в тромбоцитах и легких. PGH_2 в воде или в нейтральных буферных системах распадается на PGE_2 и PGD ; восстановление PGH_2 хлоридом олова(II) приводит к образованию одного лишь

Механизм, изображенный на рис. 19.2, подтверждается тем, что 1) удаление атома водорода от C-13 в молекуле арахидоновой кислоты является скоростьюлимитирующей стадией синтеза PGE_2 (или $\text{PGF}_{2\alpha}$); 2) атомы кислорода при C-9, C-11 и C-15 происходят из атмосферного кислорода и 3) атомы кислорода при C-9 и C-11 в PGE_2 , например, происходят из одной и той же молекулы O_2 .

Высокоочищенная циклооксигеназа, выделенная из предстательной железы барана, катализирует превращение арахидоновой кислоты в PGG_2 . Гомогенный фермент ($M\ 70\ 000$) содержит слабосвязанный гем, который необходим для проявления активности, и, кроме того, негемовое железо. Инкубация очищенного фермента с арахидоновой кислотой приводит к образованию PGD_2 (40%), PGE_2 (30%) и $\text{PGF}_{2\alpha}$ (10%). Если в инкубационную смесь добавляли восстанавливающий агент, например хлорид олова(II), то в качестве единственного продукта неферментативного восстановления PGH_2 образуется $\text{PGF}_{2\alpha}$. Это позволило предположить, что как гемовое, так и негемовое железо принимает участие в циклооксигеназном мультиферментном комплексе реакций, в результате которых образуется PGG_2 .

Превращение арахидоновой кислоты в PGG_2 блокируется ингибиторами циклооксигеназы жирных кислот. Наиболее известным среди этих ингибиторов являются аспирин (ацетилсалициловая кислота) и ряд других противовоспалительных лекарств. Торможение аспирином обусловлено переносом ацетильного остатка от молекулы аспирина к активному центру фермента с инаktivацией последнего; такого рода механизм был предложен в качестве объяснения некоторых известных фармакологических эффектов аспирина.

Реакции, изображенные на рис. 19.2 для синтеза PGE_2 и $\text{PGF}_{2\alpha}$, происходят также в процессе синтеза PG_1 -соединений из эйкоза-8,11,14-триеновой кислоты или реже встречающихся PG_3 -соединений из эйкоза-5,8,11,14,17-пентаеновой кислоты (рис. 17.3), хотя в настоящее время нет работ, в которых были бы идентифицированы PGG_1 , PGG_3 , PGH_1 или PGH_3 . Простагландины серии А образуются в результате реакции дегидратации пятичленного кольца простагландинов серий Е, а простагландины серии В образуются из простагландинов серии А путем изомеризации двойной связи в циклопентановом кольце.

Установлено, что конечные продукты биосинтеза простагландинов неодинаковы в различных органах. В большинстве органов эндопероксиды простагландинов превращаются в PG серий Е и F. В настоящее время показано, что только тромбоциты селезенки и в незначительной степени легкие образуют тромбоксаны из PGG_2 и PGH_2 . В интима кровеносных сосудов, кроме того, могут синтезироваться PGI_2 . Тот факт, что тромбоксаны и PGI_2 удалось обнаружить лишь в последнее время, объясняется проведением ран-

них исследований их биосинтеза с гомогенатами семенных пузырьков как источником ферментных систем. Последующие эксперименты с гомогенатами тромбоцитов человека и аорты указали на образование тромбоксанов и PGI_2 соответственно. Фактически активность эндопероксидов простагландинов, PGI_2 и тромбоксана A_2 более значительна, чем таковая простагландинов Е- и F-серий в нескольких контрольных системах, как, например, агрегация тромбоцитов и сокращение гладких мышц. Такая высокая активность в сочетании с очень коротким периодом полупревращения (см. выше) обеспечивает механизм для осуществления выраженной биологической реакции с быстрым устранением стимулирующего агента.

Ввиду того что эндопероксиды простагландинов могут превращаться в PGI_2 и тромбоксаны, очевидно, что последние наряду с эндопероксидами и более стабильными простагландинами являются важными промежуточными соединениями биологического действия полиненасыщенных жирных кислот, которые подвергаются преобразованию при участии ферментов циклооксигеназного пути.

Активность ферментных систем биосинтеза простагландинов зависит от ряда факторов на каждой из основных стадий процесса, например при окислительной циклизации, дисмутации или восстановлении эндопероксидами. Начальное окисление продолжается лишь короткое время и прекращается в связи с ограничением скорости процесса вследствие уменьшения количества фермента. Этот эффект, по-видимому, заключается в аутокаталитической деструкции циклооксигеназы. Регуляция такого рода позволяет получение конечного лимитированного ответа, который не зависит от диффузии какого-либо удаленного продукта назад к регуляторному центру, как это часто бывает в случае растворимых цитоплазматических систем, которые регулируются по принципу обратной связи. Это лимитирующее свойство фермента вызывает необходимость в новом синтезе белка, включая избирательную индукцию образования мРНК (гл. 26) для того, чтобы ткань восстановила свою исходную способность к синтезу простагландинов. Поэтому разнообразные агенты, включая гормоны и гормонально регулируемые взаимодействия, влияющие на синтез мРНК и белка, могут определять продолжительность рефрактерного периода в способности ткани синтезировать дополнительные простагландины.

Вторым фактором, влияющим на биосинтез простагландинов, является превращение латентных форм циклооксигеназы в активные формы. Этот процесс осуществляется с помощью таких соединений, как фенол, катехоламины и др., увеличивающих оксигеназную активность. Третьим типом циклооксигеназной регуляции является воздействие на гидрофобные локусы фермента, вероятно, идентичные с таковыми для связывания субстрата. Они-то и являются местом действия аспирина (см. выше) и ряда других лекарств, которые тормозят биосинтез простагландинов.

19.3. Метаболизм

На рис. 19.3 показаны главные центры в молекуле и пути их изменений в метаболизме типичного простагландина PGE_2 ; сходные превращения описаны и для $\text{PGF}_{2\alpha}$. Внутривенное введение людям меченных тритием PGE_2 или PGF_2 приводило к быстрому образованию соответствующих 15-кето-13,14-дигидрометаболитов как результат реакций, катализируемых 15-оксипростагландин-дегидрогеназой и Δ^{13} -редуктазой. Через 1,5 мин после введения меченого PGE_2 меньше чем 3% этого соединения остается в крови, в то время как больше 40% обнаруживается в форме вышеуказанных главных метаболитов. Период полупревращения первичных простагландинов очень короткий, меньше 1 мин, а основных их метаболитов около 8 мин.

Легкие являются главным местом быстрого метаболизма внутривенно введенных простагландинов, хотя и в других тканях этот процесс идет довольно интенсивно. 15-Оксипростагландин-дегидрогеназа была частично очищена из ряда тканей. Очевидно, что два типа дегидрогеназ присутствуют в тканях млекопитающих. Одна, которая использует NAD^+ как кофактор значительно более эффективно, чем NADP^+ , найдена в легких, сердце, печени, почках и селезенке обезьян, сердце цыпленка и легких собаки. Второй тип фермента, который использует в качестве кофактора предпочтительно NADP^+ , а не NAD^+ , обнаружен в мозге и эритроцитах человека и обезьяны и в почках свиньи. Наряду с различиями в требованиях к кофакторам эти две частично очищенные дегидрогеназы различаются по своим хроматографическим свойствам, относительноному сродству к PGE_2 и $\text{PGF}_{2\alpha}$ и относительной чувствительности к ингибиторам.

Дальнейшие этапы метаболизма простагландинов происходят с помощью нескольких механизмов: одна или две стадии β -окисле-

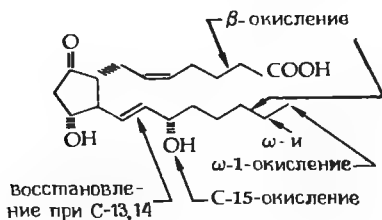
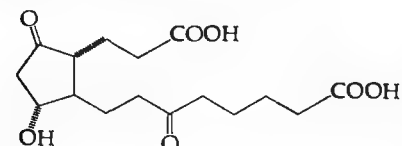


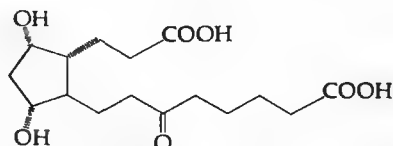
Рис. 19.3. Типы метаболитических превращений PGE_2 . Места изменений в молекуле обозначены стрелками. Как указано в тексте, начальной реакцией является окисление при C-15, за которым следует восстановление 13,14-двойной связи. Последовательность дальнейших возможных изменений не установлена, хотя, принимая во внимание содержащиеся в моче метаболиты (см. ниже), можно полагать, что за вышеуказанными двумя превращениями следуют реакции β - и ω -окисления.

ния с карбоксильного конца молекулы приводят к образованию динорных и тетранорных соединений, ω -окисление обеспечивает образование $\omega 1$ - или $\omega 2$ -окисоединений и в некоторых случаях дикарбоновой кислоты, а у некоторых видов β -окисление происходит также с ω -конца дикарбоновых кислот с образованием C_{14} -метаболитов.

Превращение $PGF_{2\alpha}$ в PGE_2 , т. е. окисление гидроксидной группы при C-9 до кетона, катализируется *простагландин-9-оксидегидрогеназой* — NAD^+ -зависимым ферментом, для которого 15-кето-13,14-дигидро- $PGF_{2\alpha}$ является непосредственным субстратом. Описано и обратное превращение простагландинов E_2 -серии в таковые $F_{2\alpha}$ -серии (рис. 19.2). Простагландины серии E могут также с помощью реакции дегидратации превращаться в B-производные. Сыворотка крови человека содержит *дегидразу*, которая превращает PGE в PGA, *PGA-изомеразу*, которая катализирует превращение PGA в PGC, *PGC-изомеразу*, которая участвует в превращении PGE в PGV. Так, в моче человека найдено большое число метаболитов, образованных в результате сочетания вышеперечисленных реакций. *Главными продуктами* метаболизма PGE_2 и $PGF_{2\alpha}$ являются



7 α -окси-5-11-дикетотетранорпростан-1,16-диевая кислота



5 α , 7 α -диокси-11-кетотетранорпростан-1,16-диевая кислота

Кроме этого, как показано на рис. 19.3, происходит одноэтапное β -окисление от ω -конца нижней боковой цепи, а также восстановление 15-кето-13,14-дегидросоединения, образующегося после начальной стадии окисления при C-15.

19.4. Биологическое действие

Различные виды действия простагландинов трудно обобщить, ибо трудно описать внушительный ряд реакций организма на простагландины, изучить видовую специфичность различных простагландинов, способы их введения, дозировки, а также факторы, сопровождающие воздействие, такие, например, как анестезия. Наряду с этим надо учитывать тканевый фактор, т. е. природу ткани, на которой изучается действие PG. PGE_1 и PGE_2 стимулируют активность аденилатциклазы, особенно в эндокринных железах. Од-

нако эти же простагландины ингибируют активность аденилатциклазы в жировой ткани. Несмотря на указанные затруднения, мы все же попытаемся кратко суммировать основные наблюдаемые реакции человеческого организма на простагландины. Простагландины серий Е и F могут в принципе вызывать противоположные эффекты, а в некоторых случаях даже PGE₁ и PGE₂, т. е. простагландины одной и той же серии, могут оказывать противоположное по характеру воздействие (см. ниже). Также несомненно, что многие описанные действия простагландинов, перечисленные ниже, являются физиологическими и фармакологическими эффектами. Детальное сопоставление всех эффектов простагландинов не входило в задачу данной книги, но они рассмотрены в соответствующей литературе, помещенной в конце этой главы.

19.4.1. Простагландины и циклический АМР (сАМР)

Реакции организма на простагландины могут напоминать реакции, обычно связанные с сАМР. В зависимости от природы ткани простагландины увеличивают либо уменьшают синтез сАМР аденилатциклазой или же его расщепление фосфодиэстеразой (гл. 11). Так, отмечена стимуляция синтеза сАМР простагландинами в большинстве тканей, отвечающих и на действие других агентов, например гормонов, увеличением содержания сАМР. С другой стороны, в таких тканях, как жировая ткань, в которой уровень сАМР может снижаться в ответ, например, на инсулин, также может наблюдаться снижение образования сАМР в присутствии простагландинов. Фактически при определенных экспериментальных условиях простагландины могут оказывать «антигормональное» действие, вступая в антагонистические взаимоотношения не только с катехоламинами (см. ниже), но также и с полипептидными гормонами, вызывающими расщепление жиров (гл. 48).

19.4.2. Метаболизм простагландинов

Анализ влияния простагландинов на метаболизм обычно крайне сложен вследствие использования в эксперименте животных различных видов и неодинаковой дозировки, применения нестандартизированных способов введения и затруднений в оценке того, является ли реакция на простагландин прямой или опосредованной. Разнообразные эндокринные железы, например щитовидная железа, кора надпочечников, яичники и паращитовидные железы, отвечают на введение простагландинов увеличением секреции гормонов. В то же время простагландины, влияя на активность аденилатциклазы, могут как бы нивелировать гормональное действие. Так, *in vivo* простагландины стимулируют образование стероидных

гормонов в надпочечниках (гл. 45) и освобождение инсулина из поджелудочной железы (гл. 46); это опосредованные эффекты простагландинов, которые осуществляются через влияние на [сАМР] в тканях-мишенях. В противоположность этому простагландины оказывают прямое действие на образование и секрецию гормонов щитовидной железы (гл. 42) и гормонов желтого тела (гл. 44).

Простагландины серий Е, особенно PGE_1 , тормозят липолиз в жировой ткани *in vitro* и уменьшают липолиз, стимулированный катехоламинами (гл. 46) и другими липолитическими гормонами (гл. 48). *In vivo*, однако, низкие дозы PGE_1 способны стимулировать липолиз у человека, вероятно, путем не прямой стимуляции выделения катехоламинов, что проявляется также в форме гипергликемии.

PGE_1 и PGE_2 заметно ускоряют мобилизацию Ca^{2+} из костей. Этот эффект вызывается прямым действием простагландинов, независящим от гормона паращитовидных желез (гл. 43), и основан на стимуляции функций остеокластов (клеток, рассасывающих кость). В присутствии противовоспалительных, негормональных лекарственных, которые тормозят простагландин-синтеазу, значительно уменьшается количество этих клеток, тогда как простагландины увеличивают их число и активность. Избыточным образованием простагландинов в злокачественной ткани частично может объясняться гиперкальцемия и остеолиз, наблюдаемые у больных некоторыми видами рака.

Прямое добавление какого-либо простагландина к ткани-мишени *in vitro* может вызвать ответы, не наблюдающиеся при исследованиях *in vivo*, что, вероятно, до некоторой степени связано с быстрой инактивацией простагландинов в условиях тестирования *in vivo*. Оценка этих ответов, далее, затруднена в связи с отсутствием соответствующей информации, касающейся эндогенного образования простагландинов в многочисленных местах их синтеза. Проявление многих эффектов простагландинов, опосредованное через стимуляцию аденилатциклазы, создает дальнейшие трудности для уточнения того, какие метаболические эффекты простагландинов можно определить как обусловленные только этими компонентами. Так, при изучении влияния простагландинов на углеводный метаболизм, так же как и на другие стороны метаболизма (см. ниже), обнаружено заметное освобождение катехоламинов, стимулированное простагландинами. При изучении системы гликоген-синтазы и фосфорилазы печени крысы было обнаружено, что внутривенное введение PGE_1 вызывает прямое ингибирование *фосфатазы синтазы D* (разд. 15.3.6). Однако наблюдающееся при этом значительное увеличение активности *фосфофосфорилазы* (разд. 15.4) представляет собой опосредованный эффект, связанный с усилением выделения катехоламинов в надпочечниках под влиянием PGE_1 .

19.4.3. Действие на сердечно-сосудистую систему

Внутривенное введение PGE_1 или PGE_2 увеличивает кровоток путем общего расширения сосудов с уменьшением периферического сопротивления. Эти изменения находят отражение в увеличении сердечного выброса, сопровождающегося уменьшением артериального кровяного давления. В коже подопытных животных наблюдается увеличение проницаемости капилляров, а у человека отмечена стойкая эритема сосудов кожи, сопровождаемая появлением волдырей и отека. Это воспалительное действие простагландинов можно предотвратить противовоспалительными агентами, в том числе аспирином. По-видимому, синтез простагландинов в месте воспалительного очага частично может быть блокирован агентами, которые ингибируют циклооксигеназную систему синтеза простагландинов (см. выше).

PGE_1 — эффективный ингибитор агрегации тромбоцитов и антагонист cAMP, стимулирующего слипание тромбоцитов. Напротив, PGE_2 ускоряет агрегацию тромбоцитов, способствуя внутрисосудистому свертыванию крови. Тромбообразующее действие PGE_2 *in vivo* может достигаться и при внутривенном введении предшественника этого простагландина — арахидоновой кислоты. Полученные в последнее время данные свидетельствуют о том, что тромбоксан A_2 является более мощным агентом, чем PGE_2 , в ускорении агрегации тромбоцитов и что тромбоксан A_2 высвобождается из агрегированных тромбоцитов. Было высказано предположение о том, что такое освобождение тромбоксана A_2 из агрегированных тромбоцитов в местах повреждения эндотелия может вызывать сужение сосудов, включая спазм больших коронарных артерий.

PGI_2 (рис. 19.2) является мощным ингибитором агрегации тромбоцитов, и было показано, что он синтезируется микросомальной фракцией гомогенатов кровеносных сосудов.

PGI_2 обладает двумя важными фармакологическими свойствами, которые обуславливают противодействие PGI_2 тромбоксану A_2 ; дело в том, что PGI_2 является наиболее мощным из всех известных в настоящее время ингибиторов агрегации тромбоцитов и, кроме того, расширяет сосуды. Предполагается, что в результате соприкосновения тромбоцитов с эндотелием нормальных кровеносных сосудов происходит высвобождение PGG_2 , субстрата для образования PGI_2 (рис. 19.2); действие этого механизма способствует предотвращению агрегации тромбоцитов и сужению кровеносных сосудов. Если же тромбоциты вступают в соприкосновение с эндотелием кровеносных сосудов, который имеет разрывы или повреждения вследствие патологических изменений, то из-за недостаточной концентрации фермента, катализирующего образование простагглина PGI_2 , количество последнего снижается; при этом агрегирующее действие тромбоксана A_2 , который синтезируется из эндо-

пероксида, должно превалировать над антиагрегирующим действием PGI_2 , что приводит к тромбозу и местному спазму сосудов.

Отметим, что у крыс со спонтанной гипертензией, обследованных в предгипертензивном периоде, нарушения почечного катаболизма достигали уровня, характерного для взрослых животных, еще до повышения артериального давления и сопровождалось увеличением содержания почечных простагландинов. Очевидная неспособность разрушать простагландины, приводящая к *поражению почек*, рассматривается как один из этиологических факторов в этой экспериментальной модели гипертонии у животных.

19.4.4. Действие на водно-электролитный обмен

Все изученные простагландины усиливают ионный поток через эпителиальные мембраны. Введение PGE_1 или PGA_1 в почечную артерию собак увеличивает объем мочи и выделение Na^+ , K^+ и Cl^- . Напротив, сообщалось, что местное образование PGE_2 в почке подавляет выведение Na^+ и рассматривается как возможный фактор в этиологии почечной гипертонии (см. выше). Возможная роль простагландинов как гормонов, участвующих в регуляции выведения натрия с мочой, обсуждается в гл. 35.

19.4.5. Действие на нервную систему

Простагландины присутствуют в нервной ткани и освобождаются при раздражении периферических нервов. Введенные простагландины повышают температуру тела, оказывают седативное и транквилизирующее действие и являются антагонистами противосудорожных препаратов. Простагландины модулируют действие адренергических факторов, например норадреналина (гл. 45), и являются антагонистами некоторых эффектов этих катехоламинов.

19.4.6. Действие на желудочно-кишечный тракт

Простагландины тормозят желудочную секрецию, но стимулируют секрецию поджелудочной железы и секрецию слизи в кишечнике, а также заметно усиливают моторику кишечника. Стимулируя кишечную аденилатциклазу, простагландины могут ингибировать поступление Na^+ в клетки слизистой оболочки, что сопровождается увеличением секреции Cl^- . Эти эффекты в сочетании с увеличением секреции H_2O и кишечной моторики являются основанием для развития вызываемой простагландинами диареи.

19.4.7. Влияние на репродуктивную систему

Простагландины, особенно $\text{PGF}_{2\alpha}$, стимулируют активность матки в период беременности; это нашло практическое применение при вызывании аборта, а именно изгнании плода и плаценты. Что-

бы вызвать аборт, требуются очень маленькие количества простагландинов, введенных внутривенно или непосредственно в полость матки. Как *in vitro*, так и *in vivo* $\text{PGF}_{2\alpha}$ вызывают рассасывание функционирующего желтого тела и могут таким образом облегчать прерывание беременности, снижая уровень прогестерона в плазме крови (гл. 44 и 48).

19.4.8. Воздействия на бронхи, трахею и гладкие мышцы

Простагландины серии F вызывают сокращение, а простагландины серии E расслабление мышц бронхов и трахей у животных различных видов, в том числе у человека. Как PGE_1 , так и PGE_2 являются сильными бронходилататорами при применении их в аэрозолях как людьми, так и животными, страдающими бронхоспазмами. В противоположность этому $\text{PGF}_{2\alpha}$ вызывает интенсивное сокращение бронхов и бронхоспазм.

Влияние $\text{PGF}_{2\alpha}$ на гладкие мышцы матки было описано выше. В течение ряда лет было известно, что специфический модулятор, названный веществом, сокращающим *аорту кролика* (rabbit aorta contracting substance (RCS)), выделяется при анафилаксии в легких сенсibilизированных морских свинок. Недавно установили, что это вещество является смесью PGG_2 , PGH_2 и тромбоксана A_2 , причем большая часть RCS-активности связана именно с тромбоксаном A_2 . Согласно существующему мнению, выделение RCS контролируется декапептидом, который стимулирует образование эндопероксидов PG и тромбоксана A_2 путем ускорения освобождения арахидоновой кислоты из легочной ткани. Стероидные противовоспалительные средства блокируют это освобождающее действие (разд. 19.2) и таким образом предотвращают образование эндопероксидов и тромбоксана A_2 в противоположность аспирину и близким к нему негормональным противовоспалительным лекарствам, которые непосредственно ингибируют активность циклооксигеназы (разд. 19.2).

19.4.9. Воспалительное действие

Введение простагландинов подопытным животным увеличивает воспалительную реакцию, вызванную, например, гистамином. Простагландины, образуемые в местах, связанных с повреждением, ожогами или вредными воздействиями, ведут себя как медиаторы воспалительной реакции. Способность таких агентов, как аспирин или другие лекарства, тормозить воспалительную реакцию, связана с их ингибирующим действием на простагландинсинтазу (разд. 19.2).

19.4.10. Иммунное действие

Ингибирующее действие простагландинов на иммунный ответ объясняется тем, что активация антигенами тимусзависимых лимфоцитов, имеющая значение в иммунологическом ответе (гл. 47), ингибируется PGE_1 . В противоположность этому сообщалось, что PGE_1 усиливает иммуногенность клеток селезенки как *in vivo*, так и *in vitro*. Кроме того, макрофаги, которые в иммунологических реакциях функционируют в тесном взаимодействии с лимфоцитами, изменяя их активность, также продуцируют и секретируют простагландины типа Е. Изучению роли простагландинов в модуляции иммунных реакций придается все большее значение. Предполагают, что продукция простагландинов злокачественными клетками (см. выше) может иметь отрицательные последствия для иммунной системы организма-хозяина и, таким образом, может затруднить иммуно-терапевтические подходы к лечению новообразований у человека.

19.4.11. Воздействия на кожу

Воспалительные влияния простагландинов, описанные выше, частично являются результатом их способности вызывать местное увеличение секреции гистамина. Кроме этого, простагландины увеличивают проницаемость кожи и вызывают местную гиперемию, обусловленную их свойством расширять кровеносные сосуды (см. выше).

19.4.12. Влияние на глаза

Простагландины вызывают мейоз и увеличение внутриглазного давления при прямом введении в глаза подопытных животных.

19.4.13. Механизм действия простагландинов

Вариабельность картины действия различных простагландинов, описанная выше, позволяет считать, что в тканях-мишенях имеется не один-единственный рецептор, а несколько. Более того, различия в характере действия PGE_1 и PGE_2 , а также PG серий Е и F свидетельствуют о том, что небольшие структурные изменения могут иметь большое значение и обуславливать силу и характер ответной реакции. Действие отдельных простагландинов на сокращение матки и желудочно-кишечной мускулатуры, секрецию, транспорт ионов и различные метаболические процессы привлекли внимание к роли Ca^{2+} и циклического АМР в механизме действия простагландинов. Однако наблюдаемые противоположные эффекты простагландинов на уровень сАМР в тканях, зависящие от вида изучаемой ткани, и на сопряжение интенсивности потока Ca^{2+}

со стимуляцией аденилатциклазы (гл. 11) в настоящее время дают возможность только для спекулятивных рассуждений по вопросу о молекулярной основе действия простагландинов.

19.5. Краткие итоги

Совершенно очевидно, что простагландины являются сильнодействующими, широко распространенными веществами, активными в первую очередь в местах их биосинтеза. За исключением эффекта ингибирования агрегации тромбоцитов, а следовательно, и нормального свертывания крови, вызываемого *in vivo* высокими дозами или продолжительным введением ингибиторов простагландинсинтазы, например аспирина, другие разнообразные эффекты простагландинов были выяснены при введении этих веществ в фармакологических дозах. Остается еще неясным, вызывает ли недостаточность простагландинов дополнительные вредные последствия и не может ли эндогенная сверхпродукция простагландинов играть роль этиологических факторов в заболевании.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

- Cuthbert M. F.*, ed., *The Prostaglandins*, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1973.
Horton E. W., *Prostaglandins*, Springer-Verlag New York Inc., New York, 1972.
Karim S. M. M., ed., *Prostaglandins: Chemical and Biochemical Aspects*, University Park Press, Baltimore, 1976.
Karim S. M. M., ed., *Prostaglandins: Physiological, Pharmacological and Pathological Aspects*, University Park Press, Baltimore, 1976.
Ramwell P. W., ed., *The Prostaglandins*, vols. 1 and 2, Plenum Publishing Corporation, New York, 1973, 1974.

Обзорные статьи

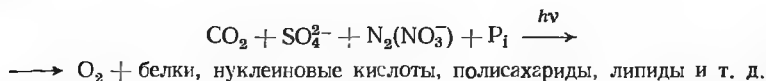
- Andersen N. H.*, *Ramwell P. W.*, *Biological Aspects of Prostaglandins*, *Arch. Intern. Med.*, 133, 30—50, 1974.
Oesterling T. O., *Current Status of the Prostaglandins*, *Am. J. Hosp. Pharm.*, 31, 355—361, 1974.
Samuelsson B., *Structures, Biosynthesis and Metabolism of Prostaglandins*, pp. 107—155, in: *S. J. Wakil*, ed., «*Lipid Metabolism*», Academic Press, Inc., New York, 1970.
Samuelsson B., *Granstrom E.*, *Green K.*, *Hamberg M.*, *Hammarstrom S.*, *Prostaglandins*, *Annu. Rev. Biochem.*, 44, 669—695, 1975.
Zor W., *Lamprecht S. A.*, *Mechanism of Prostaglandin Action in Endocrine Glands*, pp. 85—133, in: *G. Litwack*, ed., «*Biochemical Actions of Hormones*», vol. 4, Academic Press, Inc., New York, 1977.

Глава 20

МЕТАБОЛИЗМ АМИНОКИСЛОТ. I. РАСТЕНИЯ И МИКРООРГАНИЗМЫ

Фиксация азота и аммиака. Синтез аминокислот и фиксация серы

Растения и микроорганизмы усваивают за год 10^{12} т CO_2 , образуя различные соединения, характерные для живых организмов. Общий процесс может быть схематично представлен в следующем виде:



Метаболизм и жизненные циклы у растений и микроорганизмов направлены в основном на обеспечение роста и размножения. У них нет относительно продолжительных динамических стационарных состояний, характерных для взрослых животных. Первичным усваивающим энергию процессом является фотосинтетическая, восстановительная фиксация CO_2 , приводящая к образованию углеводов (гл. 16); синтезы всех остальных органических соединений биосферы начинаются с промежуточных продуктов метаболизма углеводного обмена. Азот и сера, необходимые для синтеза аминокислот, находятся в окружающей среде в окисленном состоянии SO_4^{2-} , N_2 и NO_3^- . Прежде чем эти элементы смогут внедриться в аминокислоты, они должны быть восстановлены. Из образовавшихся аминокислот далее синтезируются все другие азотсодержащие соединения. В этой главе суммированы современные представления о процессах, с помощью которых находящиеся в окружающей среде формы азота и серы восстанавливаются до метаболически доступных форм и, взаимодействуя с промежуточными продуктами углеводного обмена, обеспечивают синтез 20 аминокислот, характерных для всех живых организмов.

20.1. Фиксация азота

Восстановление N_2 до аммиака, обычно называемое *фиксацией азота*, может осуществляться только микроорганизмами. Растения

не могут восстанавливать азот, однако могут вступать в симбиотические отношения с бактериями своих корневых клубеньков (обычно относящимися к роду *Rhizopus*) и таким образом вносить значительный вклад в обогащение почвы азотом. Симбиотические и фотосинтетические азотфиксирующие системы в основном обеспечивают ежегодную фиксацию примерно 10^7 т N_2 . В то же время свободно живущие нефотосинтезирующие бактерии, например *Azotobacter* и *Clostridium*, вносят, по-видимому, относительно небольшой вклад в фиксацию азота; исследование таких организмов позволило, однако, получить значительную информацию о биохимии фиксации азота.

Подсчитано, что из всего количества фиксируемого азота от 10 до 15% приходится на долю сине-зеленых водорослей, осуществляющих восстановление N_2 в NH_3 с помощью нитрогеназной системы (см. ниже) такого же типа, как и у большинства клубеньковых бактерий. Происходящее в океанах восстановление N_2 осуществляется сине-зелеными водорослями; величина их вклада оказывается неопределенной, поскольку восстановление происходит только в относительно поверхностных прибрежных водах, где для водорослей оказываются доступными различные питательные вещества.

Основные компоненты биологической системы фиксации азота следующие: 1) *нитрогеназа*, — главный ферментный комплекс процесса; 2) сильные восстановители, такие, как восстановленные ферредоксин (разд. 13.2) или флаводоксин (разд. 13.2); 3) АТР; 4) система регуляции скорости образования аммиака и ассимиляции NH_4^+ ; биосинтез нитрогеназного комплекса тормозится при накоплении аммиака. Система фиксации азота должна быть изолирована от молекулярного кислорода, который инактивирует нитрогеназу и конкурирует за восстановитель (у аэробных бактерий).

Некоторые штаммы *Rhizobium* проявляют нитрогеназную активность и при культивировании в отсутствие растения-хозяина; это показывает, что данный микроорганизм обладает генетической информацией для биосинтеза нитрогеназы.

20.1.1. Восстановление азота

Стехиометрия суммарного процесса фиксации азота следующая:



«Нитрогеназа» может также катализировать восстановление соединений, содержащих тройные связи, например N_2O , NH_3 , HCN , других нитрилов и таких не содержащих азота соединений, как ацетилен. Именно восстановление последнего является основой

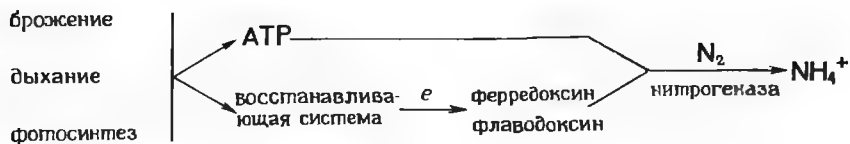


Рис. 20.1. Общая схема фиксации азота.

обычно применяемого метода определения активности нитрогеназы.

Природа доноров электронов различна у разных групп азот-фиксирующих организмов. У аэробных бактерий, например *Azotobacter* и *Rhizopium*, необходимые для фиксации азота восстановители, а также АТФ образуются в ходе углеводного обмена в реакциях с участием NADP. Фотосинтетические бактерии и сине-зеленые водоросли способны к фотохимическому образованию сильных восстановителей; при восстановлении NO_3^- (см. ниже) последний выступает как конечный акцептор электронов вместо O_2 .

Нитрогеназный комплекс был разделен на два белковых компонента, каждый из которых в отсутствие другого не обладает ферментативной активностью. Величина этих белков различна у разных микроорганизмов-источников. Один из белков имеет M от 150 000 до 270 000, содержит Mo, Fe и лабильный сульфид; другой имеет M от 50 000 до 70 000, содержит Fe и лабильный сульфид. Непосредственным восстановителем может служить либо ферредоксин (разд. 13.2.1), либо флаводооксин (разд. 13.2). Наиболее эффективным двухвалентным катионом является Mg^{2+} , однако Mn^{2+} , Fe^{2+} и некоторые другие также функционально активны. На рис. 20.1 приведена общая схема фиксации азота. Нитрогеназная реакция более детально рассматривается в гл. 13.

Регуляция активности нитрогеназы осуществляется двумя путями. «Грубый» контроль заключается в подавлении синтеза фермента избытком одного из продуктов реакции — аммиака; тонкий контроль состоит в регуляции активности фермента другим продуктом реакции, ADP, или более точнее отношением АТФ/ADP. Если образование АТФ уменьшается и отношение АТФ/ADP снижается до 0,5 или ниже, фиксация азота нитрогеназой прекращается.

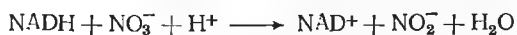
20.1.2. Восстановление нитрата

В чистой дождевой воде имеются нитраты, образующиеся в атмосфере в результате электрических разрядов. Различные микроорганизмы и большинство высших растений могут использовать в качестве источника азота нитраты, восстанавливая их в NH_3 путем двухстадийного процесса. На первой стадии, катализируемой

нитратредуктазой, происходит двухэлектронное восстановление нитрата в нитрит. В клетках бактерий и растений донором электронов служит NADH, а у грибов — NADPH. Нитратредуктазы грибов и *Chlorella* являются флавопротеидами. Путь переноса электронов (разд. 13.5.3) может быть представлен следующей схемой:

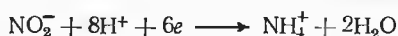


В процессе восстановления NO_3^- происходит, по-видимому, обратимое изменение валентности молибдена ($\text{Mo}^{5+} \longrightarrow \text{Mo}^{4+}$). Суммарная реакция, катализируемая нитратредуктазой из *E. coli*, следующая:



Нитратредуктаза из *E. coli* является высокомолекулярным ($M \sim 500\,000$) связанным с мембраной белком, содержащим молибден, негемовое железо и кислотно-лабильный сульфид. Фермент обратимо диссоциирует на мономеры ($M \sim 200\,000$), обладающие каталитической активностью. Имеются данные о наличии еще меньших субъединиц, обладающих ферментативной активностью, образующихся при действии протеиназ; при этом, вероятно, происходит отщепление каталитической части фермента от его фрагмента, связанного с мембраной. Синтез нитратредуктазы индуцируется нитратом и подавляется NH_4^+ .

На второй стадии процесса, катализируемой нитритредуктазой (разд. 13.5.3), осуществляется перенос шести электронов



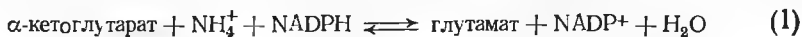
Как и в других процессах с мультиэлектронным переносом (восстановление O_2 , N_2 , SO_2^{2-}), промежуточные продукты обнаружить не удастся. Простетическими группами нитритредуктазы являются FMN, FAD, Fe_2S_2 и сирогем (разд. 13.5.2). Сирогем является непосредственным восстановителем нитрита.

Восстановителем при функционировании нитритредуктазы в растениях и водорослях выступает ферредоксин; в зеленых растениях ферредоксин может восстанавливаться либо фотосинтетически, либо за счет NADPH (в присутствии флавопротеидного фермента ферредоксин-NADPH-оксидоредуктазы). Таким образом, железосеропротеид ферредоксин может служить донором электронов для железосерной группировки нитритредуктазы; далее электрон переносится на нитрит через сирогем. Нитритредуктазы некоторых грибов, имеющие более высокую молекулярную массу, содержат связанный флавин, который ускоряет восстановление сирогема восстановленным пиридиннуклеотидом.

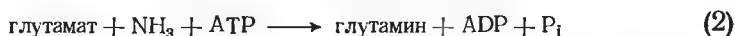
20.2. Фиксация аммиака

Аммиак независимо от пути его образования включается в состав органических соединений в результате трех главных реакций, характерных для всех живых организмов. Эти реакции приводят к образованию глутаминовой кислоты, глутамина и карбамоилфосфата. Дальнейшее использование азота карбамоилфосфата ограничено двумя возможными путями; в одном из них единственный атом азота поставляется для синтеза пиримидинов (разд. 24.1.5), а в другом — для синтеза аргинина (разд. 21.4.3.5). Источником же практически всех атомов азота, входящих в состав аминокислот или других органических соединений, являются (прямо или косвенно) глутамат или амидная группа глутамина; лишь в некоторых ферментативных реакциях вместо глутамина может использоваться аммиак.

У таких бактерий, как *E. coli* и *B. megaterium*, и у растений функционируют *глутаматдегидрогеназы*, специфичные к NADPH:



Образовавшийся глутамат используется *глутаминсинтетазой* для фиксирования второй молекулы NH_3 ; в результате образуется глутамин:



Далее из глутамина и α -кетоглутарата в результате действия *глутаматсинтазы* может происходить образование дополнительного количества глутамата:



У *E. coli* в условиях, при которых количество аммиака ограничено, большая часть глутамата несомненно синтезируется по реакции (3); следует, однако, иметь в виду, что предварительно по реакции (1) должно быть синтезировано определенное количество глутамата, необходимого для образования глутамина по реакции (3). Далее реакции (2) и (3) могут осуществляться в циклическом режиме, приводя в итоге к образованию глутамата из кетоглутарата.

20.2.1. Глутаматдегидрогеназа, реакция (1)

Фермент из *E. coli* является гексамером, состоящим из 6 субъединиц, каждая из которых имеет $M \sim 50\,000$. Для роста мутантов *E. coli*, лишенных активной дегидрогеназы, необходимы небольшие количества глутамата.

Глутаматдегидрогеназы различных организмов существенно отличаются, известно также несколько различных механизмов регуляции активности этих ферментов. Свойства ферментов млекопитающих и других позвоночных описаны в гл. 21. Свойства же этих ферментов у *Neurospora crassa* и *Saccharomyces* (дрожжи) рассмотрены ниже.

N. crassa может расти на среде, содержащей глюкозу, следы биотина и смесь неорганических солей, включающую $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. На этой среде организм вырабатывает глутаматдегидрогеназу, специфичную к NADPH [см. реакцию (1)] и, по-видимому, обеспечивающую синтез глутамата, необходимого для роста. Глутаматсинтаза не была обнаружена. NADPH-специфичная дегидрогеназа *N. crassa* — сходна с соответствующим ферментом из *E. coli*. Она состоит из 6 идентичных субъединиц, каждая из которых содержит по 452 аминокислотных остатка. Сопоставление расшифрованных участков последовательности указывает на определенную гомологию с глутаматдегидрогеназами из печени быка и кур.

Если к культуре *N. crassa* добавить глутамат и уменьшить в среде количество глюкозы, то синтез NADPH-специфичного фермента полностью подавляется; вместо него образуется NAD-специфичный фермент. Функция этого фермента заключается, вероятно, в дегидрогенировании части имеющегося в среде глутамата, обеспечивая, таким образом, образование α -кетоглутарата, вступающего в цикл трикарбоновых кислот, и NADH — донора водорода для окислительного фосфорилирования: в конечном счете это обеспечивает образование АТФ. NAD-специфичный фермент отличается от NADP-специфичного фермента по свойствам и аминокислотной последовательности. Он имеет $M \sim 460\,000$ и состоит из четырех идентичных субъединиц, причем каждая содержит более 1000 аминокислотных остатков. Таким образом, у данного организма контроль процессов усвоения азота и обеспечения энергетических потребностей регулируется путем биосинтеза или репрессии двух различных глутаматдегидрогеназ.

20.2.2. Глутаматсинтаза, реакция (3)

Этот фермент, выделенный из *E. coli* ($M \sim 800\,000$), состоит из субъединиц двух типов. Субъединицы одного типа содержат негемовое железо, лабильный сульфид, FAD и FMN, субъединицы другого типа имеют $M \sim 55\,000$. Мутанты *E. coli* и *B. Megaterium*, лишенные активной синтазы, нуждаются для роста в большом количестве глутамата. На этом основании было высказано предположение о том, что катализируемая синтазой реакция обеспечивает в основном синтез глутамата в этих организмах. Подобная же ситуация с синтезом глутамата имеет, вероятно, место также

и у высших растений, поскольку они содержат относительно небольшие количества NADPH-специфичной глутаматдегидрогеназы и большее количество глутаматсинтазы.

20.2.3. Глутаминсинтетаза, реакция (2)

Глутаминсинтетаза *E. coli* выделена в высокоочищенном состоянии. Регуляция активности этого фермента сложна, схема регуляции приведена на рис. 20.2. Фермент (M 600 000) состоит из 12 идентичных субъединиц; он инактивируется в результате переноса 5'-аденилильной группы от АТФ на фенольную гидроксидную группу специфического остатка тирозина (с образованием фосфодиэфирной связи) в каждой из полипептидных цепей. Эта реакция, называемая аденилированием, катализируется ферментом АТФ: глутаминсинтетаза—аденилилтрансферазой ($M \sim 130$ 000). Реактивация аденилированной глутаминсинтетазы осуществляется путем фосфоролитического расщепления адениллитирозильной связи с образованием ADP и активного фермента; этот процесс катализируется той же самой аденилилтрансферазой при участии одной из форм регуляторного белка, который обозначается P_{II} (M 50 000).

Аденилилтрансфераза является, следовательно, бифункциональным катализатором, обеспечивающим как аденилирование, так

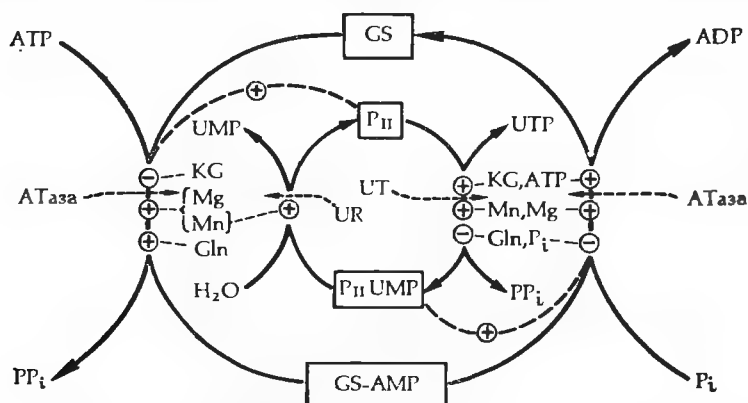
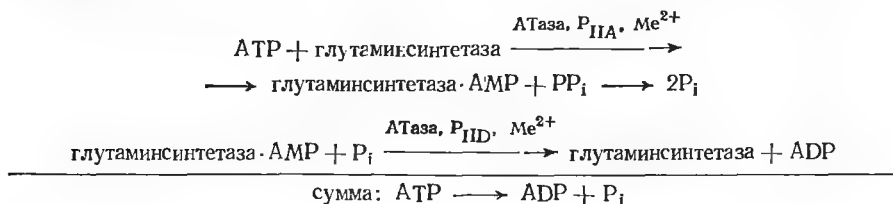


Рис. 20.2. Схема взаимосвязи между ковалентными модификациями P_{II} регуляторного белка и глутаминсинтетазы и регуляция этих модификаций различными метаболитами. АТФ — АТФ: глутаминсинтетаза—аденилилтрансфераза; УТ — уридилтрансфераза, UR — уридиллажающий фермент; GS — глутаминсинтетаза; KG — α -кетоглутарат; Gln — глутамин; (+) — стимуляция; (—) — ингибирование. P_{II} соответствует в тексте P_{IIA} , а $P_{II}UMP$ — P_{IIB} , т. е. формам P_{II} , стимулирующим аденилирование и деаденилирование соответственно. [Stadman E. R., Ginsburg A., p. 755 in P. O. Boyer, ed., The Enzymes, vol. X, 3d ed. Academic Press, Inc., New York, 1974]

и дезаденилирование глутаминсинтетазы; какая именно из реакций катализируется, зависит от регуляторного белка P_{II} . Последний может находиться в двух формах, способных к взаимопревращению; немодифицированная форма стимулирует аденилирование и обозначается поэтому P_{IIA} , модифицированная форма, P_{IID} , стимулирует только дезаденилирование. При превращении P_{IIA} в P_{IID} уридинильная группа от UTP переносится на белок P_{II} . Эта реакция катализируется специфической *уридинилтрансферазой* ($M 160\,000$), в качестве кофакторов выступают АТР, α -кетоглутарат, а также либо Mg^{2+} , либо Mn^{2+} .

Регуляция обеих функций АТР: глутаминсинтетаза—аденилилтрансферазы (АТАзы) при действии UTP, α -кетоглутарата и P_{II} позволяет предотвратить протекание бесполезного цикла, в котором происходил бы фосфороллиз АТР с образованием ADP и PP_i , и, следовательно, происходила бы значительная потеря свободной энергии:

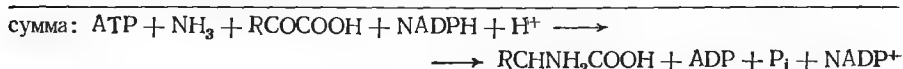
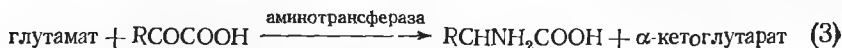
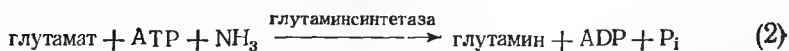
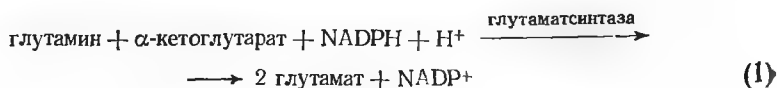


На синтез самой глутаминсинтетазы в *E. coli* и ее активность отрицательно влияет присутствие конечных продуктов метаболизма глутамина, для биосинтеза которых используется амидная группа глутамина. В число этих многочисленных соединений входят триптофан, гистидин, СТР, АМР, GMP, глюкозамин-6-фосфат, NAD, аспарагин, глутамат и карбамоилфосфат. Кроме того, тормозящее действие на активность фермента оказывают глицин, аланин и серин.

Сложный контрольный механизм, регулирующий у *E. coli* активность глутаминсинтетазы, не является универсальным для бактерий. Так, очищенный фермент из *B. subtilis*, по-видимому, не контролируется путем аденилирования, он не может также служить субстратом для глутаминсинтетаза—аденилилтрансферазы. Глутаминсинтетаза животных тканей рассматривается в следующей главе.

Глутамин занимает центральное место в азотистом обмене. Он является не только составной частью многих белков, но служит также источником азота при биосинтезе упомянутых выше соединений; кроме того, он участвует в рассмотренной выше глутаматсинтазной реакции. Сопряжение глутаматсинтазной реакции с синтезом глутамина и различными реакциями переаминирования

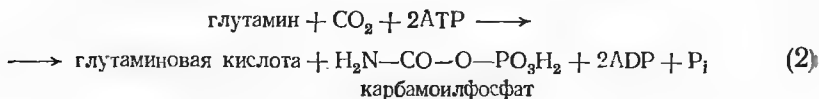
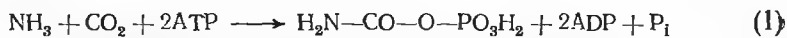
(разд. 20.3.2) является главным путем АТР-зависимого необратимого синтеза практически всех аминокислот.



Роль глутамина в других биосинтетических процессах обсуждается в других разделах этой книги.

20.2.4. Синтез карбамоилфосфата

Образование *карбамоилфосфата*, катализируемое *карбамоилфосфатсинтазой*, является общей начальной стадией процессов синтеза аргинина и пиримидинов, протекающих далее различными путями. В дрожжах и у *Neurospora* имеются два различных фермента, один из которых катализирует реакцию (1), а другой — реакцию (2):



Предполагается, что в ходе первой реакции образуется связанный с ферментом карбоксилфосфат $\text{HO}-\text{CO}-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$, который, взаимодействуя с NH_3 , образует связанный с ферментом *карбамоил* $-\text{CO}-\text{NH}_2$; последний в свою очередь реагирует с АТР, в результате образуется карбамоилфосфат.

Ферменты другой природы, состоящие из двух неидентичных субъединиц, функционирующие у *E. coli* и *S. typhimurium*, катализируют обе приведенные выше реакции. Тяжелая субъединица (М 110 000) фермента из *S. typhimurium* катализирует синтез карбамоилфосфата, используя NH_3 , но не глутамин. При добавлении легкой субъединицы (М 45 000) полностью восстанавливается способность использовать также и глутамин. Фермент активируется орнитинном и тормозится UMP; это регулирующее действие, по-ви-

димому, обеспечивает адекватный контроль за образованием карбамоилфосфата в соответствии с потребностями клетки в аргинине и пиримидинах. Действие этих эффе́кторов реализуется путем влияния на средство фермента к АТР.

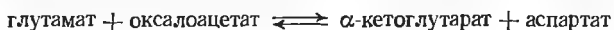
У этих ферментов карбамоилфосфатсинтетазная активность при использовании в качестве субстрата NH_3 примерно в два раза меньше, чем в случае глутамина (причем в условиях, когда концентрация глутамина в 10 раз меньше, чем NH_3). Это позволяет понять особую роль глутамина, обеспечивающего эффективный синтез карбамоилфосфата путем переамидирования. При рН клеточного содержимого, только около 1% «аммиака» находится в ионизированной форме. В случае же глутамина фермент встречается с незаряженной NH_2 -группой; таким образом, клетка избегает высоких концентраций NH_4 , оказывающих токсическое действие. У высших растений и животных выработалась способность использовать глутамин для многих подобных процессов.

Карбамоилфосфатсинтетазы животных рассматриваются в следующей главе.

20.3. Синтез аминокислот

20.3.1. Общие соображения

Используя в качестве субстратов промежуточные продукты углеводного обмена и три рассмотренные выше соединения, в составе которых фиксируется аммиак, клетки растений могут синтезировать все остальные 18 аминокислот. Это осуществляется в ходе процессов различной сложности, описываемых как одиночными, так и многостадийными реакциями. Для некоторых аминокислот достаточно высокие скорости синтеза могут быть предсказаны на основе равновесного характера соответствующих реакций. Так, процесс переаминирования, в результате которого образуется аспарагиновая кислота, имеет константу равновесия, близкую к 1.



Эта реакция беспрепятственно протекает слева направо, пока в реакционной среде есть оксалоацетат и возможно образование глутамата из α -кетоглутарата, NADPH и NH_3 . Некоторые аминокислоты синтезируются подобным же образом. Другие, однако, образуются более сложным путем.

Постоянное образование всех аминокислот обеспечивается благодаря тому, что большинство путей их синтеза практически необратимы, т. е. сопровождаются значительным освобождением свободной энергии. В общем случае это освобождение энергии проис-

ходит в результате реакций, в которых используется энергия АТР, гидролизующегося до АДФ и P_i . Еще более эффективными являются реакции, сопряженные с гидролизом АТР до пирофосфата $АТР \rightarrow АМР + PP_i$; далее пирофосфат может необратимо гидролизаться: $PP_i \rightarrow 2P_i$. В других случаях синтез сопряжен с реакцией восстановления, в которой участвует пиридиннуклеотид; при этом равновесие сильно смещено в направлении продукта восстановления, как, например, в рассмотренной выше глутаматдегидрогеназной реакции. При ознакомлении с последующим материалом следует учесть, что детальные данные о ферментах, участвующих в рассматриваемых процессах, получены в основном при исследовании ферментов немногих бактериальных видов, в первую очередь *E. coli*, вследствие их относительно большей доступности. В гл. 13 показано, что эти клетки обычно используют в качестве восстановителя NADH. Только на последующих стадиях эволюции сформировались ферменты биосинтеза, специфичные к NADPH. Следовательно, в тех случаях, когда в качестве восстановителя для бактериального фермента указан NADH, то весьма вероятно, что соответствующие ферменты растений используют для этой цели NADPH.

Индивидуальные стадии в ходе синтезов аминокислот часто оказываются под контролем одного из регуляторных механизмов, рассмотренных в гл. 11. Во многих случаях (табл. 20.1) образующаяся аминокислота выступает как отрицательный аллостерический эффектор фермента, катализирующего «ключевую» стадию на пути, ведущем к ее образованию (рис. 11.2). В одном случае имеется ключевая стадия, предшествующая точке разветвления, ведущая к двум различным аминокислотам, а именно лизину и треонину. Она регулируется различным образом у разных организмов. Так, образование β -аспартилфосфата (разд. 20.3.1) катализируется у *E. coli* тремя различными ферментами, один из них специфичен к лизину, другой — к треонину, а третий — к метионину. У других организмов эту реакцию катализирует один фермент, который слабо ингибируется каждой из этих трех аминокислот в отдельности, но сильно ингибируется при их совместном действии (*согласованное торможение по типу обратной связи*).

Значительно более медленная регуляция осуществляется путем *репрессии* данной аминокислотой синтеза фермента, катализирующего ключевую стадию на пути биосинтеза этой аминокислоты. Может также наблюдаться репрессия образования всех ферментов биосинтетического пути, включая ключевую стадию.

Примеры различных типов контрольных механизмов будут приведены в последующем изложении. Об их функционировании можно судить по поразительным различиям в росте бактерий на средах разного состава. Клетка, которая растет на среде, содержащей неорганические соли и углеводы, должны синтезировать все аминокислоты.

Таблица 20.1

Некоторые примеры ингибирования процессов биосинтеза аминокислот конечными продуктами

Аминокислота	Ингибируемая реакция	Организм или ткань
Аргинин	Глутаминовая кислота $\rightarrow$ N-ацетилглутаминовая кислота	<i>E. coli</i>
	N-Ацетилглутаминовая кислота $\rightarrow$ N-ацетилглутамат-5-фосфат	<i>Micrococcus glutamicus</i>
	N-Ацетилглутамил- γ -полуальдегид $\rightarrow$ N-ацetylорнитин	<i>E. coli</i>
	Орнитин $\rightarrow$ цитруллин	<i>E. coli</i>
Цистеин	Гомоцистеин $\rightarrow$ цистатионин	Печень крысы
Гистидин	АТФ + 5-фосфорибозилпирофосфат $\rightarrow$ фосфорибозил-АТФ	<i>S. typhimurium</i>
Изолейцин	Треонин $\rightarrow$ α -кетомасляная кислота	<i>E. coli</i>
Лейцин	α -Кетоизовалерьяновая кислота + ацетил-СоА $\rightarrow$ α -изопропил-яблочная кислота	<i>Neurospora</i>
Лизин	Аспарагиновая кислота $\rightarrow$ β -аспартилфосфат	<i>E. coli</i>
	Аспартилполуальдегид $\rightarrow$ 2,3-дигидропиколиновая кислота	<i>E. coli</i>
Метионин	О-Ацетилгомосерин + цистеин $\rightarrow$ цистатионин + уксусная кислота	<i>Neurospora</i> , дрожжи
	Гомосерин $\rightarrow$ О-сукцинилгомосерин	<i>S. typhimurium</i>
	Аспарагиновая кислота $\rightarrow$ β -аспартилфосфат	<i>E. coli</i>
Пролин	Глутаминовая кислота $\rightarrow$ глутамилполуальдегид	<i>E. coli</i>
Серин	Фосфосерин $\rightarrow$ серин	Печень крысы
Треонин	Аспарагиновая кислота $\rightarrow$ β -аспартилфосфат	<i>E. coli</i>
	Аспартил- β -полуальдегид $\rightarrow$ гомосерин	<i>Rhodopseudomonas spheroides</i>
	Гомосерин $\rightarrow$ 4-фосфогомосерин	<i>E. coli</i>
Триптофан	5-Фосфошикимовая кислота $\rightarrow$ антраниловая кислота	<i>E. coli</i>
Валин	Пировиноградная кислота $\rightarrow$ α -ацетомолочная кислота	<i>Aerobacter aerogenes</i>

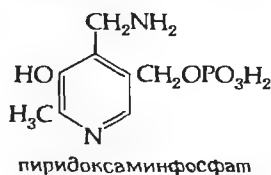
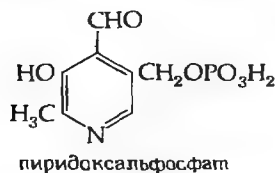
жислоты, пурины, пиримидины и т. д. Если же ее поместить на среду, содержащую все 20 аминокислот, то последние будут поглощаться из среды и использоваться для синтеза белков, при этом сама клетка либо будет синтезировать небольшое количество аминокислот, либо вообще не будет их синтезировать.

Многие микроорганизмы способны к полному самообеспечению, т. е. они могут синтезировать все аминокислоты. В противоположность этому *Lactobacilli* (хорошо растущие в молоке, белки которого поставляют все аминокислоты) практически не способны синтезировать аминокислоты *de novo* и в отношении обеспечения аминокислотами оказываются полностью зависимыми от окружающей среды.

По-видимому, все растительные клетки могут синтезировать полный набор аминокислот. Пути, описанные ниже, были изучены главным образом на бактериях, дрожжах и плеснях. Полагают, что биосинтез аминокислот высших растений происходит подобным образом, однако в настоящее время относительно мало известно о регуляторных механизмах, функционирующих в их клетках.

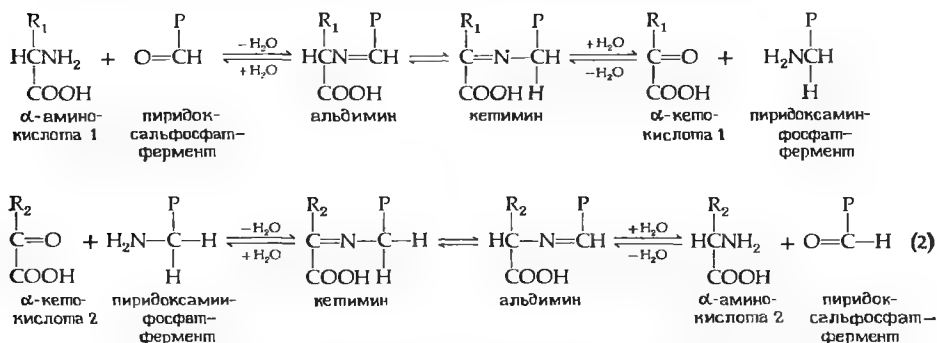
20.3.2. Переаминирование

Процесс переноса аминогруппы глутамата на другие углеродные цепи называют *переаминированием*; прототипом этого процесса является реакция синтеза аспартата, приведенная в разд. 20.3.1. Катализирующие процесс ферменты называют *аминотрансферазами*; их полные названия включают названия обоих участвующих в реакции аминокислот, например *глутамат-аспартат-аминотрансфераза*. Почти во всех реакциях одним из участников является глутамат. В качестве кофермента обычно выступает пиридоксальфосфат, который в ходе каждого реакционного цикла проходит стадию пиридоксаминфосфата. Только две аминокислоты — треонин и лизин, имеют аминокруппы изначально, а не приобретают их в результате реакции переаминирования.



Был предложен рациональный механизм реакции переаминирования (гл. 9). Ниже приведена последовательность стадий для оди-

ночного цикла функционирования фермента. Р обозначает молекулу пиридоксальфосфата, связанную с ферментом:

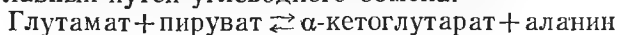


У микроорганизмов обнаружены полиспецифичные аминотрансферазы. Две аминотрансферазы *E. coli* были получены в гомогенном виде. Одна из них является в основном *аспартатаминотрансферазой*, однако ее субстратами могут служить также ароматические аминокислоты. Другой фермент является *трансферазой ароматических аминокислот*. Величины $V_{\max}$ и K_m для общих субстратов и K_m для пиридоксальфосфата этих ферментов различны, они отличаются также по термостабильности и оптимальному значению рН. Ферменты имеют сходный аминокислотный состав; каждый из них состоит из двух субъединиц.

Сведения о свойствах аминотрансфераз из растительных тканей относительно ограничены. Как и у микроорганизмов, наиболее активно происходит переаминирование между аспартатом и α -кетоглутаратом, а также между алалином и α -кетоглутаратом. Две формы высокоочищенной аспартатаминотрансферазы были выделены из зерен овса. Одна из форм (M 130 000) по свойствам, по-видимому, сходна с аминотрансферазой из тканей млекопитающих (разд. 21.4.1). Другая форма имеет близкую молекулярную массу, но отличается по аминокислотному составу.

20.3.2.1. Аланин

Алалин образуется в результате переаминирования между глутаматом и пируватом, который, подобно α -кетоглутарату, образуется в ходе главных путей углеводного обмена.



20.3.2.2. Серин

Образование серина начинается с окисления 3-фосфоглицерата (с участием NAD^+). Образующийся 3-фосфооксипируват вступает

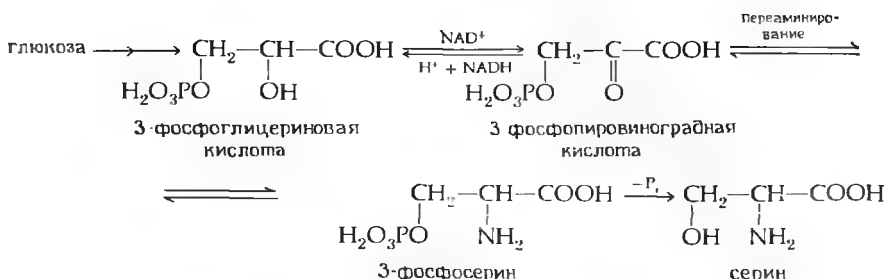
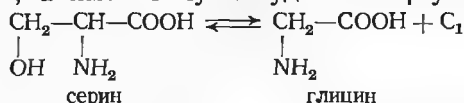


Рис. 20.3. Путь биосинтеза серина.

в реакцию переаминирования с глутаматом, это приводит к образованию 3-фосфосерина, который далее гидролизуеться серинфосфатазой. В бактериальных системах серин выступает как отрицательный эффектор по отношению к 3-фосфоглицератдегидрогеназе и к фосфатазе (рис. 20.3).

20.3.2.3. Глицин

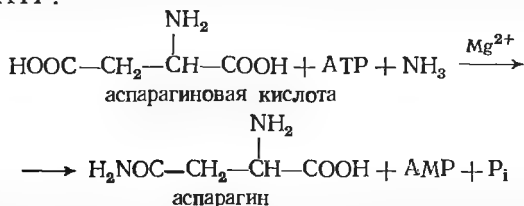
Образование глицина происходит в результате относительно простой реакции, а именно путем удаления β -углерода серина.



Этот процесс не только поставяет глицин, необходимый для синтеза белков, но и является также источником *активных* одноуглеродных соединений (на уровнях окисления CH_3OH , HCHO или HCOOH). В результате соответствующих превращений последних оказывается возможным присоединение групп —CH_3 , CH_2OH и —CHO к различным соединениям. Метаболизм одноуглеродных соединений будет рассмотрен подробнее в гл. 22.

20.3.2.4. Аспарагин

В микроорганизмах синтез аспарагина, катализируемый *аспарагинсинтетазой*, осуществляется из аспарагиновой кислоты и NH_3 за счет энергии АТФ.



В противоположность ферментам тканей млекопитающих (разд. 21.4.3.3) большинство бактериальных ферментов не могут использовать вместо NH_3 глутамин.

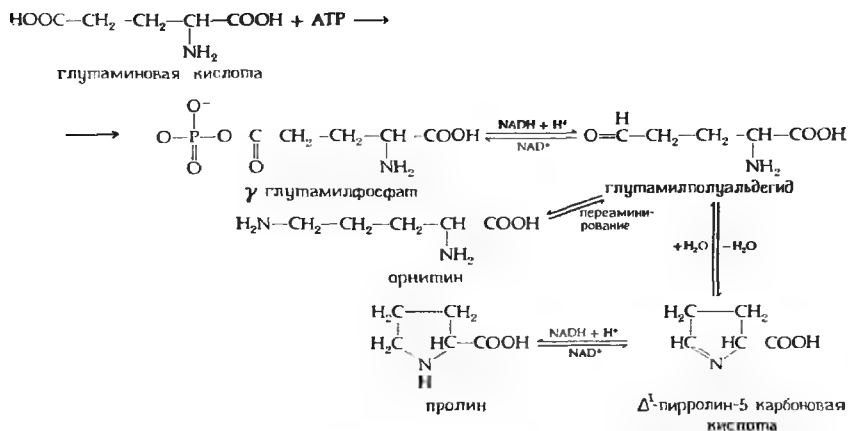


Рис. 20.4. Взаимосвязь путей синтеза орнитина и пролина.

Вопрос о биосинтезе аспарагина в растениях еще не изучен полностью, известно, однако, что некоторые растения используют для этой цели аспартат. Некоторые растения синтезируют весьма большие количества аспарагина. Например, в семенах люпина при определенных условиях роста растения может накапливаться (в расчете на сухую массу) более 20% аспарагина.

20.3.2.5. Пролин и орнитин

У большинства микроорганизмов непосредственным предшественником пролина и орнитина является 5-углеродная цепь глутаминовой кислоты. Последовательность реакций начинается с восстановления γ -карбоксильной группы глутаминовой кислоты. Оно осуществляется в результате реакции, аналогичной обратимому взаимопревращению 3-фосфоглицеринового альдегида и 3-фосфоглицериновой кислоты, происходящему в ходе гликолиза, при этом образуется глутамил- γ -полуальдегид. В результате замыкания кольца образуется Δ^1 -пирролин-5-карбоновая кислота, далее следует восстановление (за счет NADH), и образуется пролин (рис. 20.4). Таким образом, в рассмотренной последовательности реакций происходит гидролиз АТФ и осуществляются две восстановительные стадии.

Переаминирование глутамил- γ -полуальдегида со второй молекулой глутаминовой кислоты могло бы явиться простым путем образования орнитина (обеспечиваемым как гидролизом АТФ, так и стадией восстановления). Если, однако, такой путь и осуществляется, то он, по-видимому, не играет большой роли у микроорганизмов и высших растений. Доминирующими являются, вероятно, два

других сходных пути. У *E. coli* глутаминовая кислота перед реакцией с АТФ подвергается N-ацетилированию с образованием α -N-ацетилглутаминовой кислоты. Это предотвращает спонтанное замыкание кольца при восстановлении α -N-ацетилглутамилфосфата до соответствующего γ -альдегида. После переаминирования ацетильная группа удаляется путем гидролиза (рис. 20.5, а). Таким образом, эффективное протекание процесса обеспечивается не только энергией восстановления и энергией гидролиза АТФ, но также и энергией гидролиза ацетил-СоА. У высших растений, однако, процесс осуществляется более экономично. Наряду с *глутамат-ацетилазой* у них функционирует также *орнитин-глутамат-транс-ацетилаза*. В этом случае при синтезе орнитина ацетилирование глутамата происходит не за счет молекулы ацетил-СоА, а в результате переноса ацетильной группы от α -N-ацетилорнитина (рис. 20.5, б, реакция 4); при этом завершается синтез одной молекулы орнитина и одновременно начинается синтез следующей. Этот путь позволяет клетке экономить энергозатраты, поскольку после запуска процесса дальнейшая потребность в ацетил-СоА отпадает.

Орнитин не включается в белки. Он является лишь промежуточным соединением в синтезе аргинина. Вероятно, поэтому у бактерий именно аргинин подавляет синтез ферментов, функционирующих на пути, начинающемся с ацетилирования глутамата; аргинин действует также на эти ферменты как прямой отрицательный эффектор (по механизму обратной связи). В то же время восстановление глутамата до соответствующего полуальдегида тормозится не аргинином, а пролином.

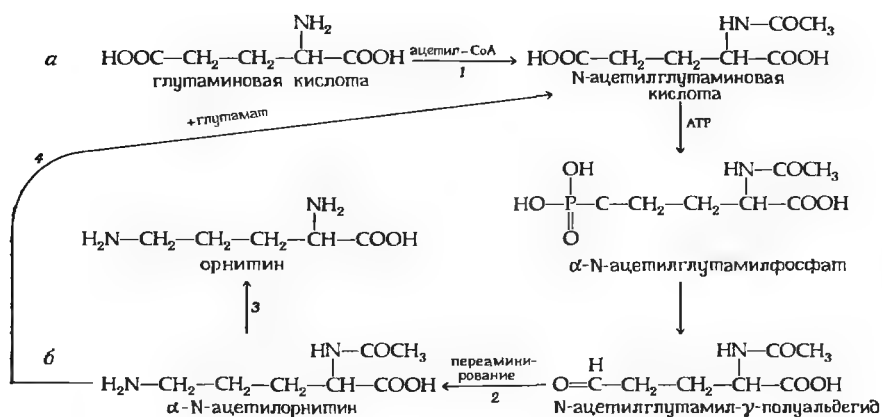
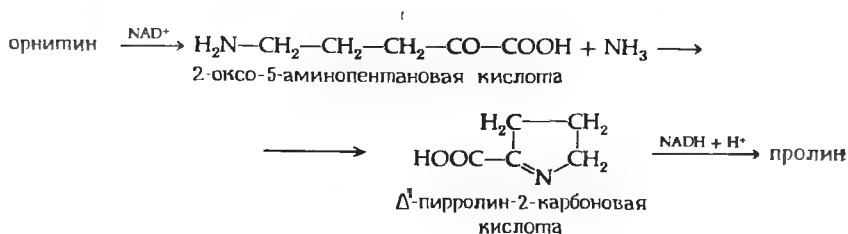


Рис. 20.5. Пути синтеза орнитина в микроорганизмах (а) и в высших растениях (б). 1 — ацетилаза; 2 — аминотрансфераза; 3 — ацетилорнитиназа; 4 — орнитин-глутамат-транс-ацетилаза.

Прямое превращение аргинина в пролин и NH_3 , обнаруженное у *Clostridia*, катализируется *орнитинциклазой*; перед циклизацией происходит дезаминирование α -аминогруппы орнитина, как показано ниже. Предполагают, что эта реакция протекает следующим образом:



Связанный с ферментом орнитин окисляется связанным с ферментом NAD^+ в 2-оксо-5-аминопентановую кислоту с освобождением NH_3 . В связанной оксоаминопентановой кислоте происходит замыкание кольца с образованием Δ^1 -пирролин-2-карбоновой кислоты; затем пирролиновое кольцо восстанавливается связанным NADH и образуется пролин, который покидает фермент. Отметим, что в рассматриваемом процессе интермедиатом является пирролин-2-карбоновая кислота, в то время как в рассмотренном выше процессе интермедиатом служило соответствующее производное по 5-положению.

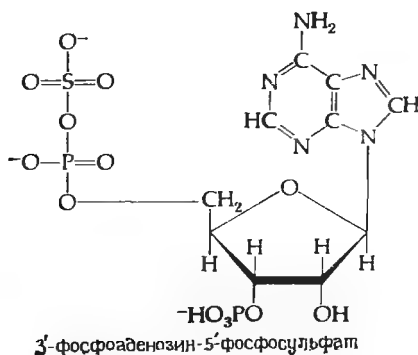
20.4. Фиксация серы

20.4.1. Синтез цистеина

Для образования цистеина растениями и микроорганизмами необходим H_2S . Однако в окружающей среде обычно имеется SO_4^{2-} ; встречается также $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (тиосульфат), а в некоторых случаях и элементарная сера. Известны микроорганизмы, которые могут осуществлять восстановление SO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ и элементарной серы, используя их, подобно NO_3^- , вместо O_2 в качестве конечных акцепторов цепи транспорта электронов. В этих случаях поток электронов от восстановленных пиридиннуклеотидов (через флавопротеиды и цитохромы) обеспечивает образование АТФ. Высшие растения при синтезе цистеина должны использовать SO_4^{2-} .

Начальной стадией утилизации SO_4^{2-} является образование 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфата, который является универсальным реагентом при образовании эфиров сульфата со спирта-

ми и фенольными соединениями, а также с полисахаридами в большинстве живых организмов, включая млекопитающих.

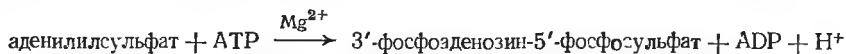


Это соединение образуется в результате двухстадийного процесса. Первая стадия катализируется *АТР-сульфурилазой*. Фермент специфичен по отношению к АТР или dАТР; оптимальным катионом для фермента из бактерий является Mg^{2+} , а для фермента млекопитающих — Mn^{2+} .



АТР — сульфурилаза (М 430 000) из *Penicillium chrysogenum* была получена в гомогенном состоянии; она состоит из восьми идентичных субъединиц (М 56 000). Приведенная выше реакция протекает, по-видимому, по упорядоченному механизму, в ходе которого происходит нуклеофильное замещение сульфатом β -атома фосфора в комплексе фермент·АТР— Mg^{2+} с образованием аденилилсульфата и PP_i . Хотя равновесие реакции сдвинуто влево, однако предполагают, что благодаря действию неорганической пирофосфатазы в системе происходит образование аденилилсульфата.

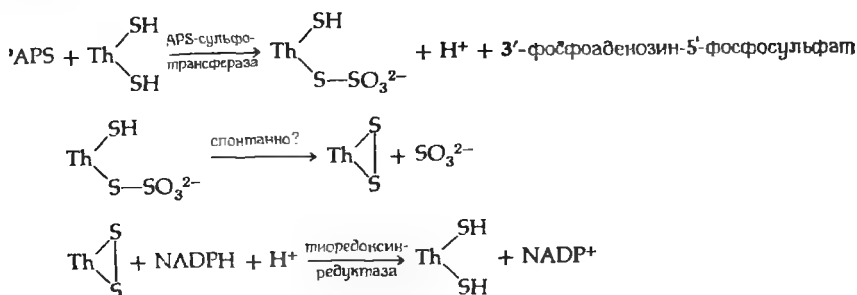
На второй стадии происходит образование 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфата; при этом аденилилсульфат фосфорилируется по 3'-положению своего рибозного остатка; реакция катализируется *аденилилкиназой*



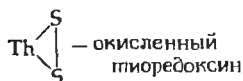
20.4.1.1. Образование SO_3^{2-}

Сульфит может образоваться из 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфата (PAPS) в результате последовательности реакций, ката-

лизируемой в дрожжах тиоредоксиновой ферментной системой (разд. 13.2).



Обозначения

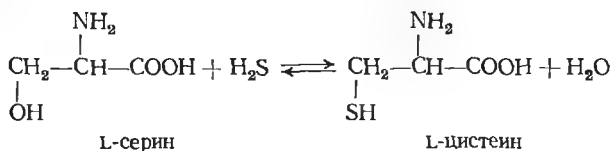


В растениях и водорослях по сходному механизму происходит, вероятно, восстановление аденилилсульфата, а не PAPS.

Восстановление сульфита до сульфида катализируется *сульфит-редуктазой*, как описано в разд. 13.5.2. Образование фермента подавляется цистеином и цистином. Некоторые организмы могут осуществлять также восстановление сульфита до $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ (тритионат), $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (тиосульфат), а также до H_2S и элементной серы. В противоположность рассмотренным выше процессам у *серных бактерий* осуществляется аэробно окисление H_2S , S, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ и SO_3^{2-} до сульфата, которое используется как источник энергии.

20.4.1.2. Цистеин

Описано несколько механизмов фиксации H_2S микроорганизмами. У некоторых из них функционирует *цистеинсинтаза*, использующая в качестве кофермента пиридоксальфосфат; она катализирует реакцию



Равновесие этой реакции сдвинуто, однако, влево. Другие микроорганизмы и растения могут использовать H_2S для образования цистеина по следующим реакциям:

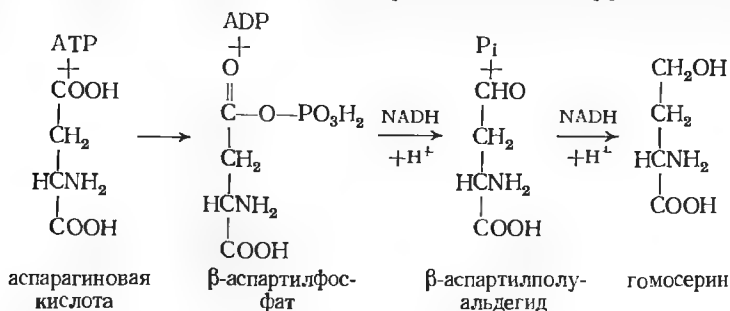


Реакция (1) катализируется *серин-трансацетилазой*, реакция (2) — *О-ацетилсерин-сульфгидрилазой*. Оба фермента входят в состав бифункционального белкового комплекса, содержащего одну молекулу трансацетилазы и две молекулы сульфгидрилазы. Однако характер реакции (2) указывает на возможность участия в комплексе помимо двух указанных выше еще и других ферментов. Поскольку образование одной молекулы цистеина связано с гидролизом одной молекулы ацетил-CoA, суммарный процесс является благоприятным для образования цистеина.

У млекопитающих образование цистеина происходит главным образом из метионина (разд. 21.4.2.3).

20.4.1.3. Синтезы из аспарагиновой кислоты

У бактерий и растений три аминокислоты *метионин*, *треонин* и *изолейцин* получают либо все углеродные атомы, либо часть их от аспарагиновой кислоты. У бактерий (но не у грибов, дрожжей и, вероятно, растений) из аспарагиновой кислоты синтезируется также лизин. Первой стадией во всех этих синтезах является образование β -аспартилфосфата за счет АТФ в реакции, катализируемой *аспараткиназой*. При изучении механизмов регуляции этого фермента у *E. coli* и ее мутантов было установлено, что имеются три различные аспараткиназы, очень сильно различающиеся по свойствам. *Аспараткиназа I* ингибируется треонином по механизму обратной связи, синтез *аспараткиназы II* репрессируется метионином, а *аспараткиназа III* аллостерически ингибируется лизином.

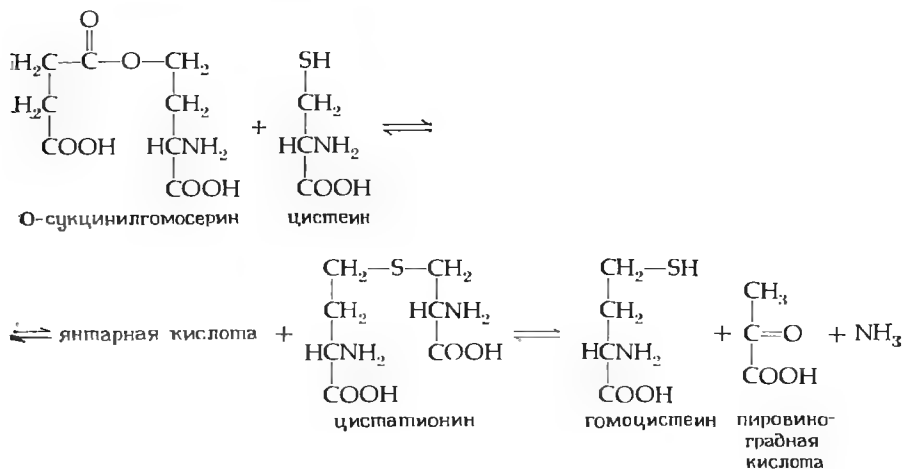


Образование β -аспартилполуальдегида сходно с образованием глутамилполуальдегида. Превращение β -аспартилполуальдегида в

гомосерин катализируется *гомосериндегидрогеназой*. На уровне гомосерина происходит разветвление путей образования метионина, треонина и изолейцина. Гомосериндегидрогеназа бактерий сильно ингибируется треонином.

20.4.1.4. Метионин

Синтез метионина начинается с превращения гомосерина в О-сукцинилгомосерин в результате ацильного переноса (донор — сукцинил-СoА), катализируемого *гомосерин-сукцинилазой*. Ингибирование фермента метионином (по механизму обратной связи) является специфической регуляторной стадией на пути синтеза метионина. Реакция О-сукцинилгомосерина с цистеином катализируется *цистатионин-γ-синтазой*; при этом образуется цистатионин — смешанный тиоэфир. Из последнего в результате реакции, катализируемой цистатионин-β-лиазой, образуются гомоцистеин, пировиноградная кислота и NH₃. У *Neurospora* в биосинтезе метионина вместо О-сукцинилгомосерина может функционировать N-ацетилгомосерин; последний образуется в результате реакции между гомосеринном и ацетил-СoА, катализируемой *гомосерин-трансацетилазой*.



У *E. coli* метионин-синтаза (гомоцистеин-метилтрансфераза) катализирует перенос метильной группы на гомоцистеин, завершая синтез метионина. Простетической группой фермента является восстановленное производное кобаламина (гл. 50). Метильную группу поставляет N⁵-метилтетрагидрофолат (разд. 21.4.2.8).

Цистатионин может рассматриваться как S-замещенный цистеин (тиоэфир). Ряд тиоэфиров был идентифицирован среди небел-

ковых азотсодержащих компонентов растений. Ферменты, подобные цистатионин-β-лиазе — пиридоксальфосфатзависимые алкилцистеинил-лиазы, имеющиеся у некоторых видов высших растений, расщепляют тиоэфиры путем β-элиминирования.



20.4.1.5. Треонин

Синтез этой аминокислоты начинается с фосфорилирования гомосерина АТР, катализируемого *гомосеринкиназой*. Пиридоксальфосфатзависимая *треонинсинтаза* катализирует превращение О-фосфогомосерина в треонин. Реакция приводит к превращению соединения с γ-гидроксидной группой в соединение с β-гидроксидной группой. Это показано на рис. 20.6.

Альтернативный путь биосинтеза треонина катализируется пиридоксальфосфатзависимой *серин-трансоксиметилферазой* (разд. 21.4.2.7)



Источником ацетальдегида, участвующего в этой и приводимых ниже реакциях, является пируват (разд. 14.4.3).

20.4.1.6. Изолейцин

Источником четырех из шести углеродных атомов изолейцина является треонин. Начальная стадия процесса катализируется *треонин-деаминазой*, использующей в качестве кофермента пиридоксальфосфат. В ходе одностадийного процесса образуется α-кетобутират (рис. 20.7).

Далее α-кетобутират конденсируется с ацетальдегидом, поставляемым α-оксипропионилтиаминпирофосфатом (разд. 12.2.1), в результате образуется α-ацето-α-оксибутират; последний восстанавливается пиридиннуклеотидом до α,β-докси-β-метилвалерата. Как показано на рис. 20.7, редко встречающаяся среди биохимических реакций пинаколиновая перегруппировка (стадия 4), за которой следует переаминирование с глутаматом, завершает путь биосинтеза. Наиболее эффективно специфическая регуляция этого пути биосинтеза может осуществляться, по-видимому, на стадии треониндеаминазы, поскольку остальные стадии катализируются относительно менее специфичными ферментами, участвующими также в синтезе валина. Известно, что деаминаза ингибируется и репрессируется изолейцином.

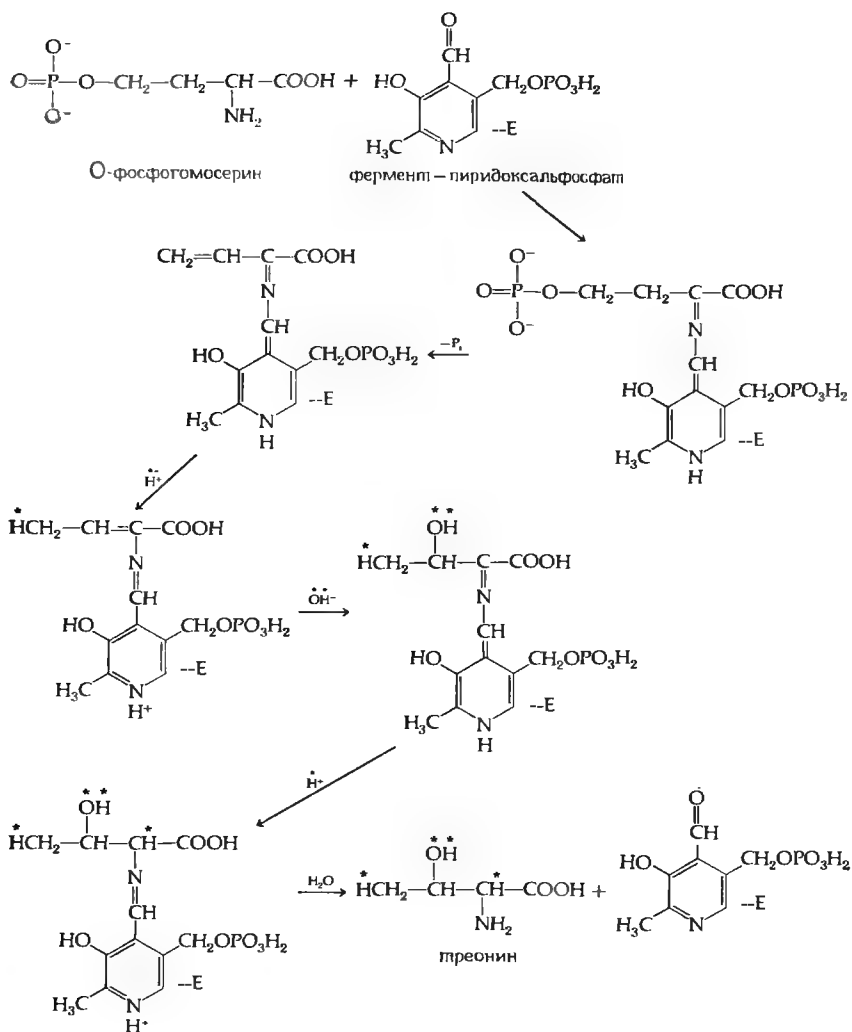


Рис. 20.6. Механизм реакции, катализируемой треонинсинтазой. Субстрат О-фосфогомосерин связывается комплексом пиридоксальфосфат — фермент, образуя шиффово основание, при этом лабилизуется α -водородный атом. Элиминирование фосфата осуществляется негидролитическим путем с расщеплением С—О-связи. β -Водородный атом, ближайший к сопряженным двойным связям, лабилизуется и элиминирован в виде протона вместе с фосфатной группой. Протон из среды присоединяется в γ -положение; в результате последующего присоединения воды по α,β -двойной связи второй протон из среды поступает в α -положение, а гидроксидная группа — в β -положение. Протоны и кислород, поступающие из среды, обозначены звездочками.

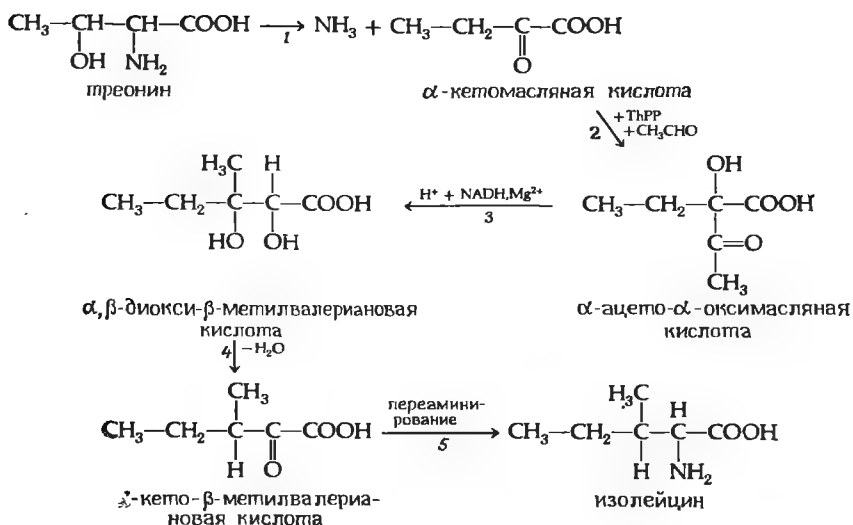


Рис. 20.7. Путь синтеза изолейцина. Ферменты обозначены номерами, стоящими около стрелок: 1 — треониндегидратаза; 2—5 обозначают те же самые ферменты, что 1—4 соответственно на рис. 20.8.

20.4.1.7. Валин

Синтез валина весьма сходен с синтезом изолейцина. Общими для обоих путей являются четыре фермента, которые находятся в клетке, по-видимому, в виде полиферментного комплекса, связанного с субклеточными структурами.

Синтез начинается с конденсации ацетальдегидного фрагмента молекулы пировиноградной кислоты со второй молекулой пирувата. Так как для реакции необходимы тиаминпирофосфат (ThPP) и Mg^{2+} , предполагают, что в качестве активного ацетальдегида выступает α -оксиэтилтиаминпирофосфат (разд. 12.2.1).

Продуктом конденсации является α -ацетомолочная кислота. Превращение последней в α, β -диоксивалерат катализирует ферментный комплекс *диоксикислота — редуктоизомераза*, требующий Mg^{2+} и использующий NADH. Этот комплекс включает *ацетоацетат-мутаза* и *редуктаза*. Первый фермент катализирует пинаколиновую перегруппировку α -ацетолактата в α -кето- β -оксизовалериановую кислоту, которая затем превращается редуктазой в α, β -диоксизовалериановую кислоту. Далее в результате реакции дегидратации образуется α -кетоизовалерат. Из последнего в результате переаминирования с глутаматом образуется валин (рис. 20.8). У *Klebsiella aerogenes*, который в обычных условиях превращает пируват в ацетон, два независимых фермента катализируют кон-

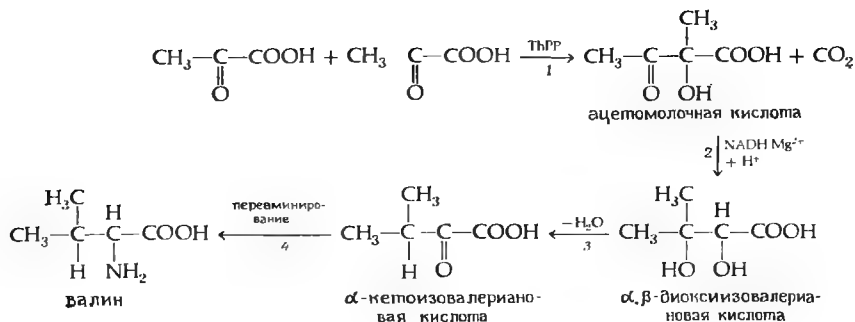


Рис. 20.8. Путь синтеза валина. Ферменты обозначены номерами, стоящими около стрелок: 1 — ацетолактатсинтаза; 2 — диоксикислота—редуктоизомераза; 3 — диоксикислота—дегидратаза; 4 — аминотрансфераза аминокислот с разветвленной цепью. ThPP — тиаминпирозофосфат.

денсацию, приводящую к образованию α-ацетолактата. Если *K. aerogenes* растет в присутствии валина, то образование одного из этих ферментов репрессируется; при этом, однако, остающейся активности (другого фермента) оказывается достаточно для образования ацетолактата в количестве, удовлетворяющем потребности роста. В то же время образование валина оказывается уменьшенным.

20.4.1.8. Лейцин

Синтез лейцина начинается с α-кетопропионата, который является также непосредственным предшественником валина. В результате конденсации с ацетил-СоА (напоминающей конденсацию при образовании цитрата) образуется изопропилачлочная кислота. Последующие стадии, приводящие к образованию α-кетопропионата, аналогичны стадиям образования α-кетоглутарата из цитрата. Последовательность реакций завершает переаминирование (рис. 20.9). У *Neurospora* первый фермент биосинтетической цепи α-изопропилмалат — синтаза репрессируется лейцином. Синтез ферментов, катализирующих последующие реакции цепи, индуцируется продуктом первой реакции; синтез же индуктора регулируется по механизму обратной связи.

20.4.1.9. Лизин

Синтез лизина осуществляется двумя различными путями. Один из них, так называемый путь диаминопимелиновой кислоты, функционирует у бактерий, некоторых классов низших грибов, водорос-

лей и высших растений. Другой, который называют путем аминокислотной кислоты, функционирует у других классов низших грибов, у высших грибов и у *Euglena*.

На диаминопимелатном пути углеродная цепь лизина синтезируется из пирувата и аспартата. β -Аспартилполуальдегид (разд. 20.4.1.2) вступает с пируватом в реакцию альдольной конденсации, катализируемую *конденсирующим* ферментом дигидропикколинат-синтазой; при этом освобождаются две молекулы воды и образуется 2,3-дигидродипикколинат. Последний превращается NADPH-зависимой Δ^1 -пиперидеин-2,6-дикарбоксилат-дегидрогеназой в Δ^1 -пиперидеин-2,6-дикарбоксилат; при гидролизе последнего образуется α -амино- ϵ -кетопимелат. У *E. coli* далее происходит сукцинирование (за счет сукцинил-CoA), а затем в результате переаминирования и десукцинирования образуется L- α , ϵ -диаминопимелат. Это соединение в результате реакции, катализируемой *эпимеразой*, превращается в *мезо*-диаминопимелат, который декарбоксилируется пиридоксальфосфатзависимой *декарбоксилазой*, специфичной к *мезо*-изомеру, с образованием лизина. Этот путь синтеза показан на рис. 20.10. У *Bacillus megaterium* для ацилирования α -амино- ϵ -кетопимелата используется не сукцинильная, а ацетильная группа.

В приведенной последовательности реакций у *E. coli* (рис. 20.10) имеются по крайней мере два регуляторных пункта. На одном из них осуществляется аллостерическая регуляция лизином аспарататкиназы III, которая катализирует первую стадию процесса, ведущую к образованию β -аспартилполуальдегида (разд. 20.4.1.3).

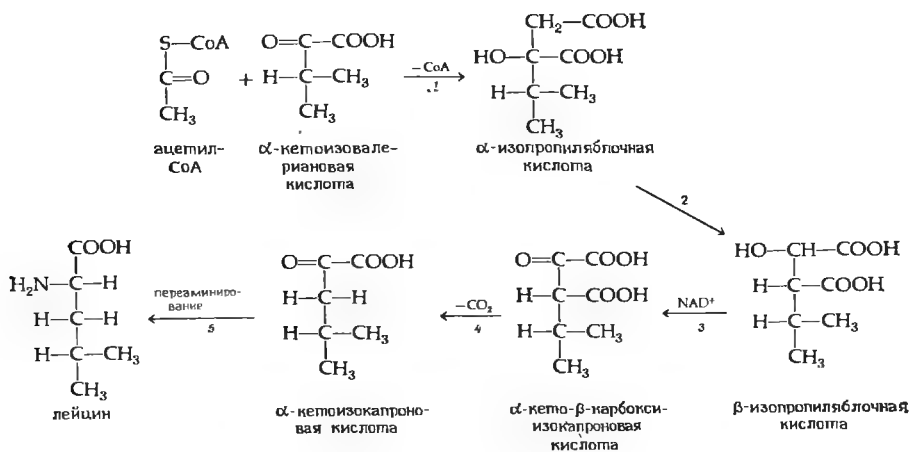


Рис. 20.9. Путь синтеза лейцина. Ферменты обозначены номерами, стоящими около стрелок: 1 — α -изопропилмалат-синтаза; 2 — α -изопропилмалат-изомеразы; 3 — изопропилмалатдегидрогеназа; 4 — декарбоксилаза; 5 — аминотрансфераза аминокислот с разветвленной цепью.

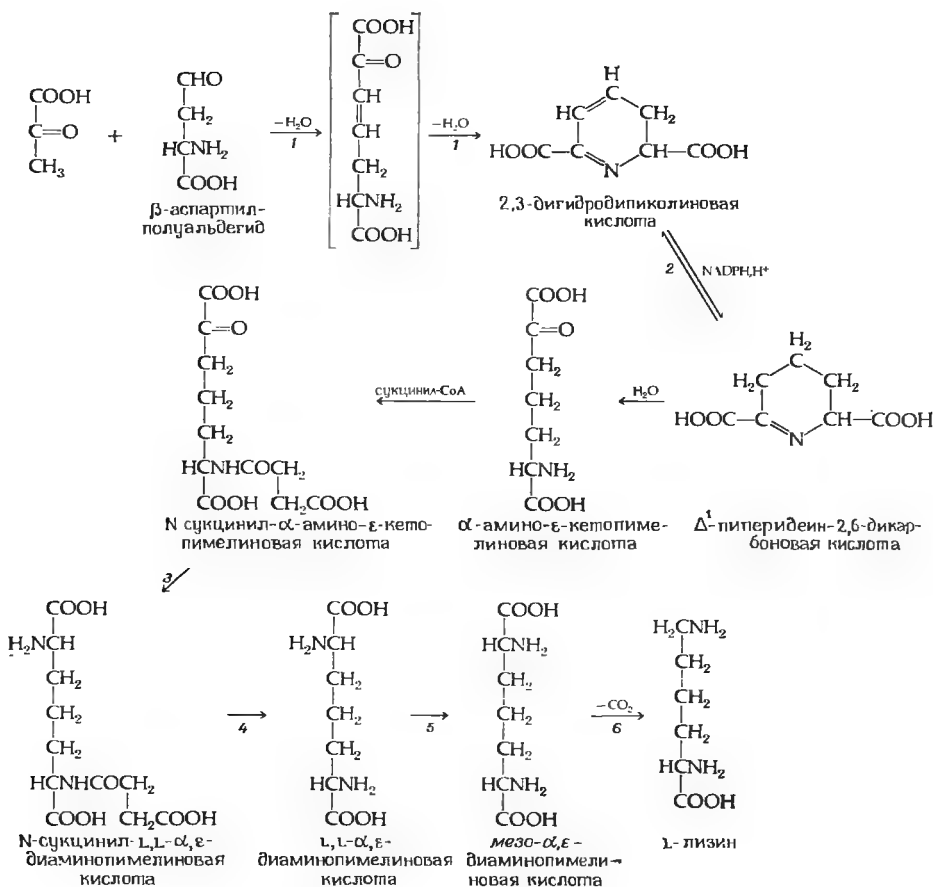


Рис. 20.10. Путь синтеза лизина (через диаминопимелиновую кислоту). Номера, стоящие около стрелок, обозначают ферменты, участие которых в качестве катализаторов либо установлено, либо предполагается: 1 — конденсирующий фермент (дигидропикколинат-синтаза); 2 — Δ^1 -пиперидин-2,6-дикарбоксилат-дегидрогеназа; 3 — N-сукцинилдиаминопимелат-глутамат-аминотрансфераза; 4 — N-сукцинилдиаминопимелат-десукцинилаза; 5 — эпимераза; 6 — диаминопимелатдекарбоксилаза.

Характерным свойством аспараткиназы III является ингибирование ее лейцином, а также синергическое ингибирование двумя аминокислотами — лейцином и лизином. Другим регуляторным пунктом при синтезе лизина является конденсация полуальдегида с пируватом (это «точка ветвления» в направлении синтеза лизина); соответствующий фермент ингибируется лизином. В данном случае осуществляется регуляция скорости первой реакции в последовательности, ведущей только к лизину.

При аминокислотном пути синтеза лизина для построения углеродной цепи используются ацетил-СоА и α -кетоглутарат. Эти два предшественника конденсируются, образуя гомоцитрат. Из последнего в ходе реакций, аналогичных реакциям цикла лимонной кислоты (рис. 12.1), образуются последовательно *цис*-гомоаконит-

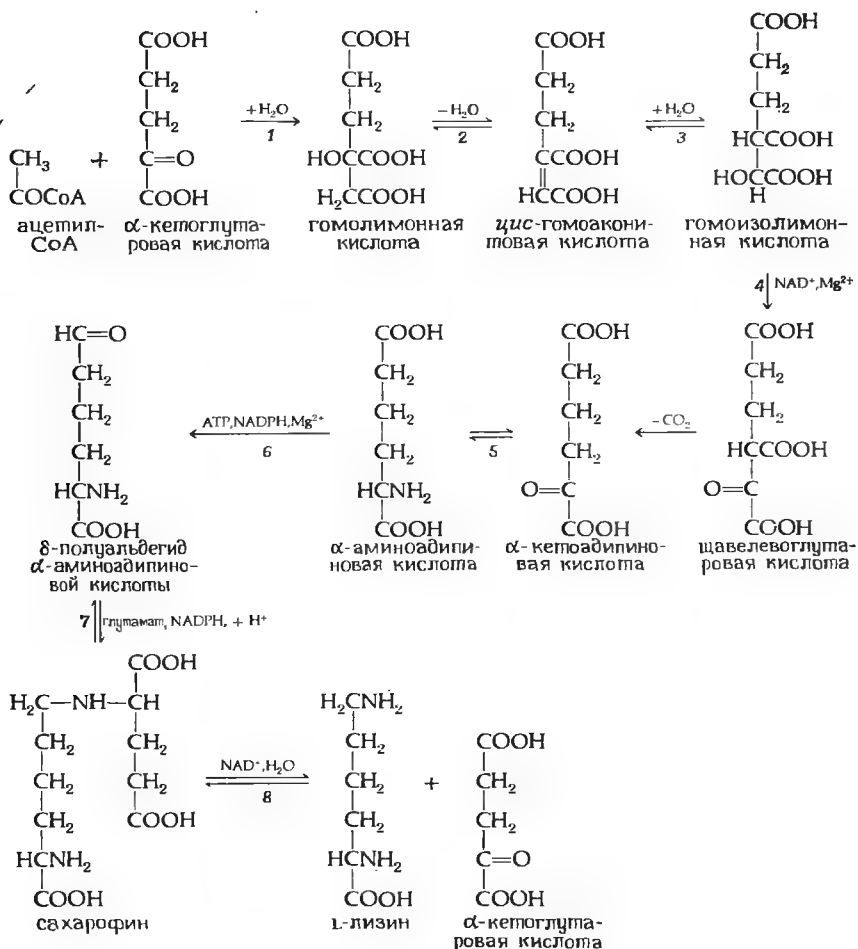


Рис. 20.11. Путь биосинтеза лизина (через аминокислотную кислоту). Номера, стоящими около стрелок, обозначены ферменты, участие которых в качестве катализаторов либо установлено, либо предполагается: 1 — гомоцитратсинтаза; 2 — *цис*-гомоакониттаза; 3 — гомоаконитатгидратаза; 4 — гомоизоцитратдегидрогеназа; 5 — α -аминоадипат-глутамат-аминогидрогеназа; 6 — α -аминоадипилполуальдегиддегидрогеназа; 7 — аминокислотилполуальдегид-глутамат-редуктаза; 8 — сакхарофиндегидрогеназа.

тат, гомоизоцитрат, оксалоглутарат и α -кетoadипат. В результате переаминирования образуется α -аминоадипат, из которого при восстановлении NADPH-зависимым ферментом образуется α -аминоадипил- β -полуальдегид. При конденсации последнего с глутаматом образуется ϵ -N(L-глутарил-2)-L-лизин, называемый *сахарофином*, поскольку он является промежуточным продуктом в синтезе лизина у *Saccharomyces*. В результате восстановительной и гидролитической реакций сахарофин превращается в лизин и α -кетоглутарат. Путь биосинтеза показан на рис. 20.11.

20.4.1.10. Фенилаланин и тирозин

Четыре углеродных атома ароматического кольца этих аминокислот поставляются эритрозо-4-фосфатом; остальные два углерода кольца, а также углероды боковой цепи поступают от фосфопирувата. Исследования, проведенные с помощью меченых предшественников, а также идентификация продуктов, накапливающихся в среде при росте мутантных штаммов, у которых оказались блокированными различные стадии синтетического пути, позволили установить общую схему биосинтеза, приведенную на рис. 20.12. Как показано на рисунке, на стадии хоризмовой (*греч.* — разветвляться) кислоты происходит разветвление путей синтеза ароматических аминокислот; образование антранилата ведет к синтезу триптофана (см. ниже), в то время как префенат является предшественником фенилаланина и тирозина. Последний образуется у млекопитающих путем гидроксирования фенилаланина (разд. 21.4.2.4), эта реакция происходит также у некоторых микроорганизмов.

Два фермента, катализирующие образование первого продукта синтетического пути (рис. 20.12) 3-дезоксид-2-кетод-7-фосфод-арабино-гептулозоновой кислоты, были выделены из экстрактов *E. coli*. Один из них ингибируется фенилаланином и триптофаном, а другой — тирозином; последний, кроме того, репрессирует синтез тирозин-чувствительного фермента. У *B. Subtilis* 3-дезоксид-2-кетод-7-фосфод-арабино-гептулозонат — синтаза проявляет свойства аллостерической системы, которая ингибируется префенатом и хоризматом; эта система является, следовательно, еще одним регуляторным механизмом, функционирующим по механизму обратной связи. Таким образом, первая стадия разветвленного процесса биосинтеза ароматических аминокислот является объектом множественной регуляции. Кроме того, у *Salmonella typhimurium* первые две реакции, специфичные для синтеза фенилаланина, а именно те, которые катализируются хоризматмутазой и префенатдегидратазой соответственно (рис. 20.12), являются объектом торможения фенилаланином (по типу обратной связи). Реакции 2—6 (рис. 20.12) катализируются полиферментным комплексом

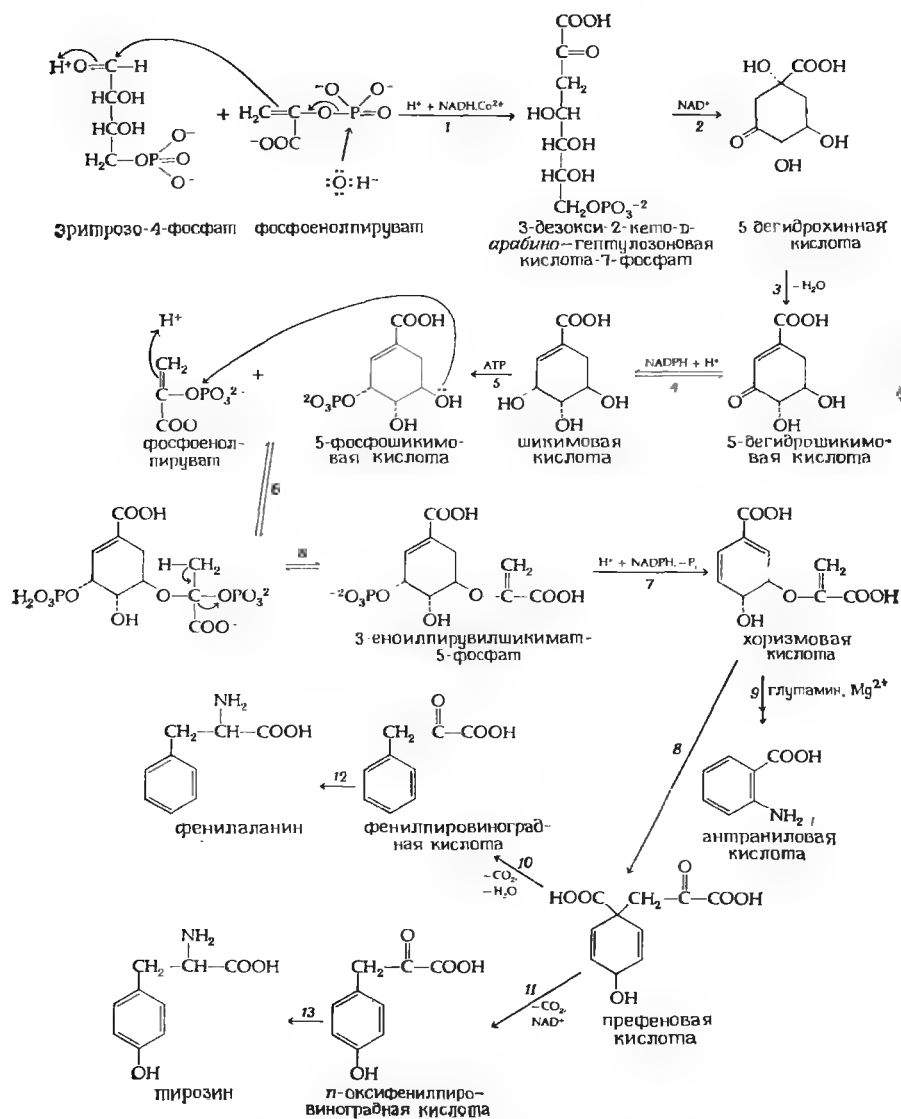
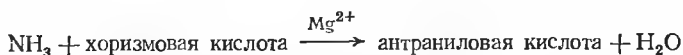


Рис. 20.12. Пути синтеза фенилаланина, тирозина и антралиловой кислоты (предшественника триптофана, разд. 20.4.1.11). Ферменты и реакции обозначены стоящими около стрелок номерами: 1 — 3-дезоксигидрокси-2-кетоглицерон-7-фосфат-синтаза; 2 — дегидрохинатсинтаза; 3 — 5-дегидрохинат-дегидратаза; 4 — шикиматдегидрогеназа; 5 — шикиматкиназа; 6 — 3-енолпирувилшикимат-5-фосфат-синтаза; 7 — хоризиматсинтаза; 8 — хоризиматмутаза; 9 — антралилатсинтаза; 10 — префенатдегидратаза; 11 — префенатдегидрогеназа; 12 — фенилаланинаминотрансфераза; 13 — тирозинаминотрансфераза.

(M 200 000), который был выделен из нескольких видов дрожжей. Пять ферментных компонентов этого комплекса ассоциированы за счет нековалентных взаимодействий. В ходе реакции 9, катализируемой антранилатсинтазой, образуется, вероятно, γ -глутамилфермент. У *B. Subtilis* антранилатсинтаза катализирует также реакцию

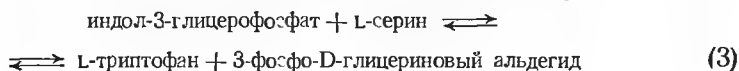
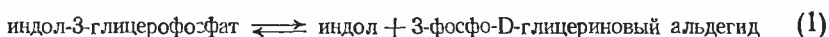


Альтернативный путь синтеза тирозина у млекопитающих, а именно его образование из фенилаланина, рассматривается в следующей главе.

20.4.1.11. Триптофан

Путь синтеза триптофана у высших растений неизвестен. У *E. coli* синтез триптофана (рис. 20.13) начинается с антранилата, который образуется в ходе реакций, ведущих к образованию и других ароматических аминокислот (рис. 20.12). Два участвующих в синтезе триптофана фермента — *индолглицерофосфат-синтаза* и *триптофансинтаза* — были получены в кристаллическом виде. Первый из них (M 44 000) образован одиночной полипептидной цепью. Триптофан-синтаза (M 148 000) является пиридоксальфосфатзависимым ферментом, который катализирует завершающие реакции последовательности, ведущей к синтезу триптофана.

Реакции, которые может катализировать этот фермент, следующие:



Весьма вероятно, что при образовании триптофана из индолглицерофосфата [реакция (3)] осуществляются реакции (1) и (2); при этом промежуточным продуктом является связанный с ферментом индол.

Изучение генетических изменений структуры *триптофансинтазы* и соответствующих функциональных характеристик позволило получить важные данные о генетических механизмах (гл. 26). Фермент из *E. coli* состоит из четырех полипептидных цепей, которые образуют две неидентичные легко разделяемые субъединицы α и β ; была установлена аминокислотная последовательность цепей. α -Цепь получена в виде мономера, а β -цепь — в виде димера β_2 . Полностью ассоциированный белок имеет состав $\alpha_2\beta_2$. Реакция

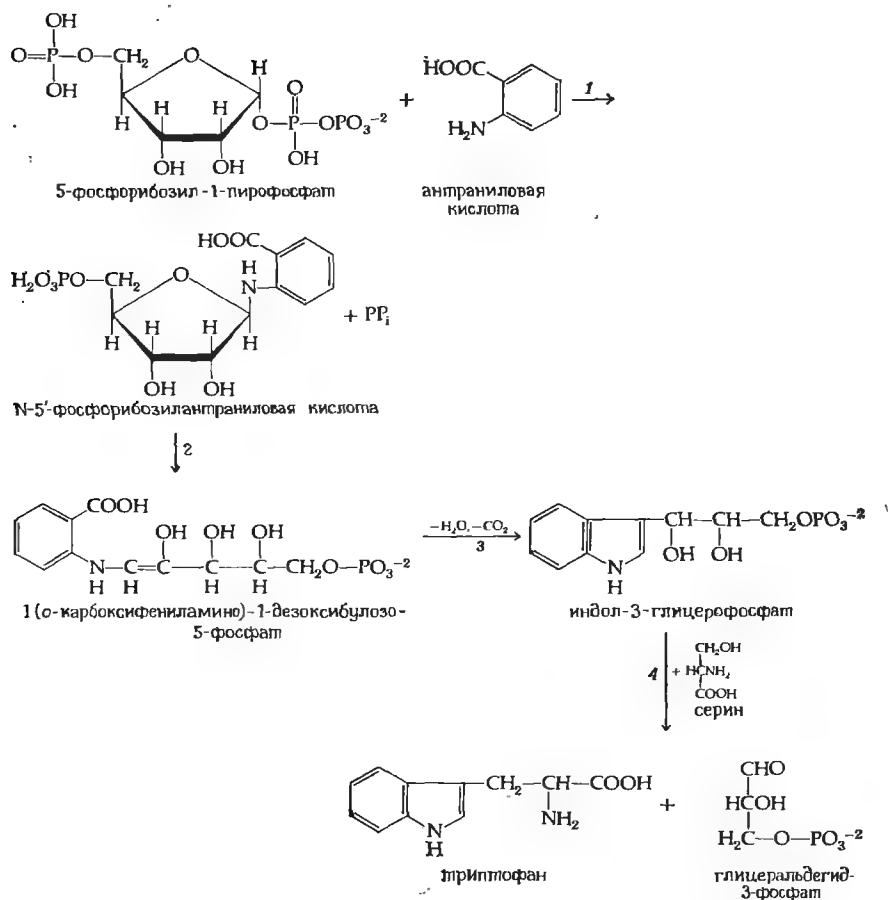


Рис. 20.13. Путь синтеза триптофана у *E. coli*. Ферменты обозначены номерами, стоящими около стрелок: 1 — антрилилат-пирофосфорилпирофосфат—трансфераза; 2 — N-5'-фосфорибозилантрилилат-изомеразы; 3 — индол-3-глицерофосфат—синтаза; 4 — триптофансинтаза.

(1) может катализироваться только α -цепью; при этом, однако, скорость реакции весьма невелика по сравнению со скоростью, наблюдаемой для полностью ассоциированного фермента; реакция (2) может катализироваться β_2 -комплексом. Мутантные α -субъединицы активируют действие β_2 -комплекса в реакции (2), и большинство мутантных β_2 -комплексов активируют действие «нормальной» α -субъединицы в реакции (1). Ферментные комплексы, образованные либо нормальными α -субъединицами и мутантными β -субъедини-

нищами, либо мутантными α -субъединицами и нормальными β -субъединицами, не способны катализировать реакцию (3).

Активность анранилат-синтазы из *E. coli* (рис. 20.12) ингибируется триптофаном; у дрожжей триптофан ингибирует и репрессирует фермент. Как уже упоминалось, у *E. coli* триптофан подавляет также фермент, который катализирует начальную реакцию пути биосинтеза ароматических аминокислот.

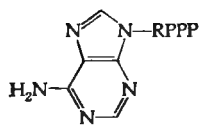
Триптофан-синтаза из *Neurospora* образована одиночной полипептидной цепью.

20.4.1.12. Гистидин

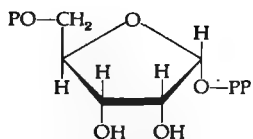
Первая стадия синтеза гистидина катализируется аллостерическим ферментом *АТР-фосфорибозилтрансферазой*, в результате реакции углеродная цепь рибозы оказывается связанной с атомом азота адениловой кислоты (рис. 20.14). При взаимодействии С-1 атома фосфорибозилпирофосфата с N-1 АТР (при этом освобождается пирофосфат) происходит превращение α -конфигурации связи в β -конфигурацию. Далее происходит раскрытие пуринового кольца АМР. После поступления атома азота от глутамина структура распадается с образованием имидазолглицерофосфата, в котором имидазольное кольцо гистидина уже полностью сформировано и присоединено к трехуглеродной цепи, и 5-амиоимидазол-4-карбоксамид-рибонуклеотида — промежуточного продукта в синтезе пуринов (разд. 24.1).

При синтезе имидазолглицерофосфата источником атомов углерода боковой цепи и двух «соединяющих» углеродов кольца являются пять углеродных атомов рибозы 5-фосфорибозил-1-пирофосфата. Фрагмент —N=C— поставляется пиримидиновой частью раскрываемого пуринового ядра. Поскольку углеродный атом этого фрагмента в ходе синтеза пуринов поступает от N¹⁰-формилтетрагидрофолата (разд. 21.4.2.8), то в конечном счете его источником является β -углерод серина или другие доноры одноуглеродных единиц. Атом N на заключительном этапе поступает от глутамина (амидный азот). Таким образом, гистидинсинтезирующая система использует часть пуринового ядра; при этом остающийся фрагмент (амиоимидазолкарбоксамидорибонуклеотид) вновь используется

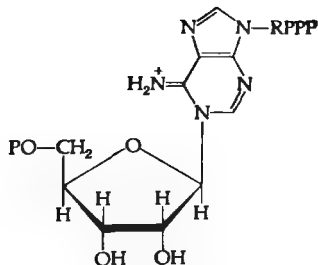
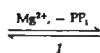
Рис. 20.14. Путь синтеза гистидина. RPPP — рибозотрифосфат; RP — рибозо-5-фосфат; PP_i — пирофосфат; P — ортофосфат. Цифры около стрелок обозначают ферменты, катализирующие реакции: 1 — АТР-фосфорибозил-трансфераза, 2 — пирофосфогидролаза; 3 — фосфорибозил-АМР-циклогидролаза; 4 — фосфорибозил-формимино-5-амиоимидазолкарбоксамидрибонуклеотид-изомераза; 5 — глутамин-амидотрансфераза; 6 — имидазолглицерофосфат-дегидратаза; 7 — 1-гистидинолфосфат-глутамат-аминотрансфераза; 8 — гистидинолфосфат-фосфатаза; 9 — гистидинолдегидрогеназа



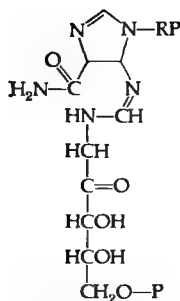
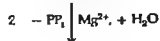
АТФ



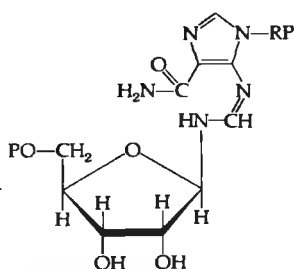
5-фосфорибозил-1-пирофосфат



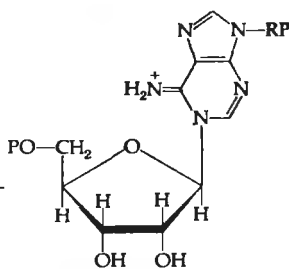
N²-(5'-фосфорибозил)-АТФ



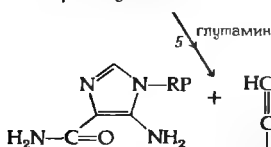
N¹-(5'-фосфорибутозил)-формимино-5-аминоимидазол-4-карбоксамид-рибонуклеотид



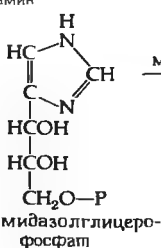
N¹-(5'-фосфорибозил)-формимино-5-аминоимидазол-4-карбоксамид-рибонуклеотид



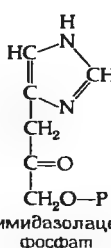
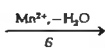
N¹-(5'-фосфорибозил)-АМР



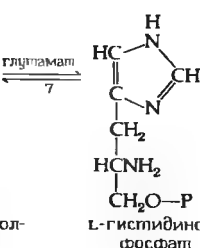
5-аминоимидазол-4-карбоксамид-рибонуклеотид



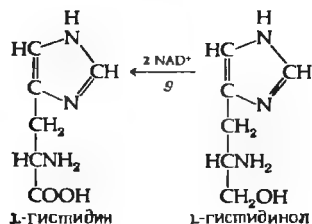
имидазолглицеро-фосфат



имидазолацетол-фосфат



L-гистидинол-фосфат



1-гистидин

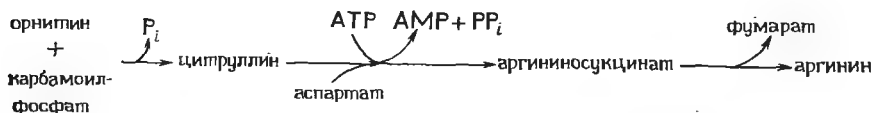
L-гистидинол

в синтезе пуринов. На последней стадии синтеза гистидина первичная гидроксидная группа гистидинола окисляется в соответствующую карбоксильную группу с помощью 2 экв. NAD^+ . Это окисление происходит на поверхности одного фермента без образования свободного альдегидного промежуточного соединения.

Рассмотренный выше сложный путь биосинтеза гистидина был в основном выяснен при использовании мутантов *E. coli* и особенно *Salmonella*. В последовательности реакций пути имеется несколько пунктов метаболического контроля. В гистидиновом опероне, содержащем 9 генов, для ферментов каждой из девяти стадий был идентифицирован соответствующий ген. Первая реакция, катализируемая АТФ: фосфорибозилтрансферазой, специфически ингибируется гистидином. Кроме того, система ферментов биосинтеза гистидина в целом является объектом координированной репрессии; так, при наличии избытка гистидина в культуральной среде репрессируется синтез всех ферментов, катализирующих промежуточные реакции синтеза гистидина.

20.4.1.13. Аргинин

Синтез аргинина начинается с орнитина; синтез последнего был уже описан (рис. 20.4). Остается указать только происхождение гуанидиновой группы. Этот вопрос был весьма обстоятельно изучен на тканях животных и в меньшей мере на тканях растений. Последовательность реакций при образовании гуанидиновой группы идентична той, которая приведена далее в разд. 21.4.3.5, а именно



Регуляция процесса осуществляется путем репрессии и ингибирования аргинином митохондриальной карбамоилфосфатсинтетазы (это действие в известной мере балансируется положительным эффекторным действием орнитина), а также ферментов, катализирующих промежуточные стадии при образовании орнитина из глутамата; кроме того, ингибируется синтез цитруллина.

20.5. Заключительные замечания

Исследование живых клеток показывает, что пул свободных аминокислот является очень небольшим. Возможные причины этого (в случае клеток животных) будут обсуждаться в следующей

главе. В микробных и растительных клетках аминокислоты редко подвергаются деградации, они синтезируются и используются для синтеза белков и огромного числа других азотсодержащих соединений. Однако ни одна из аминокислот не образуется в избыточном количестве. Даже у микроорганизма, у которого дерепрессирован соответствующий ключевой фермент, торможение по типу обратной связи предотвращает излишнее расходование исходных веществ или энергии. В рассматриваемом случае в избытке будет присутствовать только дерепрессированный фермент. В процессе эволюции сформировался совершенный механизм, поставляющий в распоряжение клетки (когда она обеспечена энергией и исходными веществами) сбалансированное количество каждой из двадцати аминокислот. Именно концентрация каждой аминокислоты определяет скорость ее синтеза, она же регулирует скорость потребления данной аминокислоты из аминокислотного пула для обеспечения соответствующих синтетических процессов.

См. литературу к гл. 23.

Глава 21

МЕТАБОЛИЗМ АМИНОКИСЛОТ.

II. МЛЕКОПИТАЮЩИЕ

Переваривание белков. Всасывание аминокислот.

Незаменимые аминокислоты.

Метаболизм аминокислот печени.

Общие аспекты метаболизма аминокислот

У животных, как и у растений и микроорганизмов, главным предназначением аминокислот является участие в синтезе белков. Кроме того, различные аминокислоты являются исходным материалом, поставляющим атом азота и фрагменты углеродной цепи, для образования большого числа азотсодержащих соединений. Способность клеток осуществлять эти синтетические процессы зависит от наличия пула аминокислот, сбалансированного в отношении потребностей клеток по каждой из 20 аминокислот. Клетки не имеют запасных форм аминокислот, подобных гликогену (для сахаров) и триглицеридам (для жирных кислот); они не могут, естественно, осуществлять синтез белковой молекулы, если отсутствует хотя бы одна из входящих в ее состав аминокислот.

У растений и микроорганизмов, как это было изложено в предыдущей главе, необходимая сбалансированная смесь аминокислот обеспечивается собственными синтетическими системами, которые регулируются по механизмам обратной связи; при этом образование каждой из двадцати аминокислот отвечает текущим потребностям. Условия жизни животных совершенно иные. Не обладая фотосинтетическими способностями, животные должны обеспечивать многие свои потребности за счет растений, микроорганизмов или других животных. Окисление и другие метаболические превращения потребляемых углеводов и липидов являются для животных источником как необходимой энергии, так и исходных веществ для синтеза различных соединений, выполняющих метаболические и структурные функции. Количество потребляемой ежедневно пищи обусловлено в основном ее калорийностью. Животные клетки не способны синтезировать *de novo* половину из 20 аминокислот; они также не могут синтезировать особую группу соединений, необходимых для метаболизма в небольших количествах, которые называют *витаминами*. В условиях, когда организм получает избыточное

количество заменимых аминокислот, он может вместо незаменимых аминокислот использовать соответствующие кетокислоты. Животные не способны синтезировать именно углеродные скелеты незаменимых аминокислот.

Можно представить такую форму животной жизни, при которой организмы, получая достаточное количество углеводов, сохраняли бы способность своих примитивных предков синтезировать аминокислоты. Абсолютная потребность организма животных в определенных аминокислотах явилась, по существу, следствием условий их существования. Удовлетворяя свои потребности в калориях за счет углеводов или жиров, животные поедают растения, микроорганизмы или других животных, которые содержат все аминокислоты и витамины. Именно это обстоятельство «позволило» животным утратить способность синтезировать различные аминокислоты и витамины, сохранив высокую жизнестойкость, о чем свидетельствует сформировавшаяся у них в процессе эволюции способность жить в самых различных условиях. Однако утрата некоторых биосинтетических способностей все же повлекла за собой определенные издержки; об этом говорит целый ряд заболеваний [например, квашиоркор (гл. 49) и пеллагра (гл. 50)], обусловленных длительным пребыванием на разбалансированной диете, в которой недостает определенных веществ.

Следует отметить также некоторые особенности метаболизма аминокислот у животных, образование которых, по-видимому, связано с характером источников питания. Даже у очень молодых растущих животных источники пищи обычно обеспечивают поставку большего количества аминокислот (в расчете на порцию продуктов с калорийностью 1000 ккал), чем это требуется для обеспечения синтетических процессов, в которых участвуют аминокислоты. У некоторых животных в течение длительного жизненного периода не наблюдается изменения веса тела, хотя количество получаемых ими аминокислот может значительно варьировать. Так, например, взрослый человек может долго сохранять постоянный вес, получая ежедневно пищу калорийностью 2000 ккал, при этом содержание аминокислот в ней может изменяться от 20 до 150 г. Сохранение метаболического баланса при столь различном количестве потребляемых аминокислот оказывается возможным благодаря функционированию механизма, который наряду с усвоением части аминокислот обеспечивает деградацию остальных. В экспериментальных условиях (и относительно редко в естественных условиях) набор аминокислот в диете может быть ограничен и не обеспечивать протекания необходимых синтетических процессов. В этом случае осуществляется (насколько возможно) ребалансирование смеси аминокислот, в результате которой азот поступивших аминокислот используется для синтеза необходимых организму аминокислот. Наконец, в жизни животного могут встречаться короткие периоды,

в течение которых оно не получает пищи; животное должно уметь приспособиться к таким неблагоприятным условиям.

Задачей данной главы является рассмотрение ряда общих аспектов метаболизма аминокислот млекопитающих.

21.1. Переваривание белков

В природных пищевых продуктах количество свободных аминокислот весьма незначительно. Аминокислоты входят в состав белков, которые подвергаются гидролизу для того, чтобы аминокислоты стали доступными для клеток. Поскольку такое гидролитическое переваривание происходит в «защищенных компартментах», гидролитические ферменты не имеют доступа к собственному содержимому животных клеток. У простейших переваривание происходит в окруженных оболочкой пищеварительных вакуолях, а у людей — в просвете кишечника. Пищеварительные ферменты синтезируются и секретируются в форме неактивных *зимогенов* (гл. 34), поэтому они не повреждают секреторных клеток, в которых осуществляется синтез. Активация зимогенов происходит в просвете кишечника. Изменения белковой структуры, сопровождающие превращения зимогена в фермент, были рассмотрены в разд. 8.7.2.1. Во всех случаях при активации происходит специфический протеолиз в области N-концевой части зимогена, что и приводит к образованию активного фермента.

21.1.1. Желудочное пищеварение

Факторы, влияющие на количество и состав желудочного и панкреатического секретов, рассматриваются в гл. 34. В данном разделе будут кратко рассмотрены ферменты, участвующие в переваривании белков, и их специфичность при действии на белки пищи. Использование специфичности протеолитических ферментов как инструмента при исследовании структуры белков рассматривалось в гл. 6.

В желудочном соке находится протеолитический фермент *пепсин*; его предшественник (зимоген) *пепсиноген* образуется и секретируется главными клетками слизистой желудка (гл. 34). Зимоген (M 40 000) превращается в пепсин (M 32 700) как под действием кислой среды желудочного сока, так и под влиянием самого пепсина; процесс активации является, следовательно, аутокаталитическим. В процессе активации с N-конца пепсиногена отщепляются 42 аминокислотных остатка в виде смеси пептидов, некоторые из этих пептидов могут действовать как ингибиторы пепсина. Эти пептиды содержат 12 остатков основных аминокислот (из 16 остатков, имеющихся в пепсиногене); их освобождение снижает изо-

электрическую точку от рН 3,7 для пепсиногена до примерно рН 1,0 для пепсина, поскольку в ферменте сильно доминирующими оказываются анионные группы. Карбоксильные группы двух остатков аспарагиновой кислоты входят в состав активного центра пепсина.

Субстратами пепсина в желудке являются либо нативные белки пищи, либо белки, денатурированные при варке пищевых продуктов. Пепсин быстро гидролизует в белках пептидные связи, образованные карбоксильными группами ароматических аминокислот (фенилаланин, триптофан или тирозин). Несколько медленнее пепсин гидролизует пептидные связи, образованные некоторыми другими аминокислотами, например лейцином и дикарбоновыми аминокислотами.

При гидролизе белков *in vitro* пепсин способен освобождать свободные аминокислоты, однако этот процесс протекает относительно медленно. Учитывая, что пища находится в желудке ограниченное время, можно считать, что *in vivo* пепсин гидролизует белки пищи в основном до смеси полипептидов. Если секреция HCl не обеспечивает поддержания кислотности желудочного содержимого на уровне значений рН 2—3 (условия оптимального действия пепсина), переваривание белков в желудке может оказаться очень незначительным. Это происходит, например, при *пернициозной анемии* (гл. 32). При *желудочной ахилии* переваривания белков вообще не происходит вследствие отсутствия в содержимом желудка как пепсина, так и кислоты.

Пепсин, подобно многим растительным и животным протеазам, вызывает свертывание молока, т. е. осуществляет первую стадию его переваривания. У жвачных животных свертывание молока происходит в результате действия *специфического* фермента *химозина*, который находится в сычуге (четвертом желудочке) молочных телят. Реакции, происходящие при свертывании молока, рассматриваются ниже (гл. 34).

Из слизистой желудка человека наряду с пепсином был выделен еще один протеолитический фермент — *гастриксин*. При исследовании структуры гастриксина, химозина и пепсина обнаружена значительная гомология последовательности, указывающая на происхождение всех трех ферментов от общего предшественника. Из слизистой желудка некоторых видов позвоночных были выделены еще три зимогена, названные *пепсиногенами В, С и D*; при их активации образуются несколько различающиеся пепсиноподобные протенназы.

21.1.2. Протеолиз в кишечнике

Поступающее в кишечник желудочное содержимое встречает смесь совершенно других протеаз. Панкреас секретирует слегка

щелочную жидкость (гл. 34), содержащую неактивные предшественники ряда протеаз, а именно *трипсиноген*, три *химотрипсиногена*, *прокарбоксипептидазы А и В* и *проэластазу*. Фермент кишечника *энтеропептидаза* специфично и быстро превращает трипсиноген в трипсин; скорость активации трипсиногена под действием энтеропептидазы в 2000 раз выше, чем скорость аутокаталитического превращения под действием трипсина. Функция энтеропептидазы является решающей, поскольку образующийся из трипсиногена трипсин осуществляет активацию всех остальных неактивных зимогенов в соответствующие активные формы.

Трипсиноген образован одиночной полипептидной цепью; в ходе активации происходит гидролиз одной связи, в результате чего освобождается N-концевой гексапептид Val-(Asp)₄-Lys зимогена. Отщепление пептида сопровождается появлением ферментативной активности и некоторыми изменениями конформации молекулы. Последовательность Val-(Asp)₄-Lys имеется у большинства известных трипсиногенов (от рыб до человека). Химотрипсиногены в результате активации превращаются в химотрипсины; характер наблюдаемых превращений был описан в разд. 8.7.2.

Щелочной панкреатический сок нейтрализует поступающее кислое содержимое желудка и обеспечивает слабощелочную среду, оптимальную для гидролитического действия панкреатических ферментов, каждый из которых имеет характерную специфичность (разд. 6.1.2.2). *Трипсин* гидролизует пептидные связи, образованные карбоксильными группами аргинина и лизина. *Химотрипсины* наиболее активны по отношению к пептидным связям, образованным карбоксильными группами фенилаланина, тирозина и триптофана. Таким образом, действие этих ферментов является аддитивным; оно приводит к более глубокому гидролизу (по сравнению с гидролизом в желудке) белков до небольших пептидов. *Карбоксипептидаза А*, цинксодержащий фермент, быстро отщепляет С-концевые аминокислотные остатки с ароматическими или алифатическими боковыми цепями. *Карбоксипептидаза В* действует только на пептиды, имеющие на С-конце остатки аргинина или лизина.

Слизистая кишечника также содержит ферменты, гидролизующие пептидные связи. Хотя эти ферменты могут секретироваться в кишечный сок, они функционируют преимущественно внутриклеточно. Гидролиз небольших пептидов может происходить после поступления их в клетки слизистой оболочки, а также в процессе транспорта через эпителиальные клетки. Экстракты слизистой кишечника содержат группу *аминопептидаз* — ферментов, которые при действии на полипептидные цепи поочередно освобождают N-концевые аминокислоты. *Лейцинаминопептидаза*, Zn²⁺-содержащий фермент, имеет широкую специфичность по отношению к N-концевым остаткам полипептида. Путем последовательного гид-

ролиза N-концевых пептидных связей фермент расщепляет пептид до свободных аминокислот. Этот фермент активируется также Mn^{2+} (последний замещает в ферменте Zn^{2+}). Ион металла образует координационный комплекс с ферментом и его субстратом. Экстракты слизистой кишечника содержат также *дипептидазы*, например активируемую Co^{2+} или Mn^{2+} *глицилглицин-дипептидазу*, которая не атакует трипептид глицилглицилглицин; для действия этого фермента необходимо, следовательно, наличие около гидролизующей связи свободных аминной и карбоксильной групп.

Последовательное действие протеолитических ферментов в желудке и тонком кишечнике приводит к гидролизу большинства пищевых белков до аминокислот. Хотя трипсин и химотрипсин действуют более быстро и эффективно в том случае, если белок предварительно подвергался действию пепсина, однако при совместном действии этих панкреатических ферментов может осуществляться эффективный гидролиз белка и без предшествующего действия пепсина. Следовательно, больные с резецированным желудком сохраняют достаточную способность использовать пищевые белки. В то же время при значительном повреждении ткани поджелудочной железы или при затруднении тока жидкости по панкреатическому протоку количество панкреатического сока, поступающего в двенадцатиперстную кишку, уменьшается; в этих условиях в фекалиях появляются значительные количества непереваренного пищевого белка.

21.2. Всасывание аминокислот из кишечника

Аминокислоты, освобождающиеся из белков пищи и самих пищеварительных секретов, быстро всасываются. Например, через 15 мин после приема человеком меченного ^{15}N дрожжевого белка ^{15}N -аминокислоты обнаруживаются в крови; максимальная концентрация аминокислот достигается через 30—50 мин после приема белка. Приведенные величины могут быть несколько меньшими, чем в норме, поскольку обследуемым давали очень небольшое количество белка и они не получали при этом углеводов или липидов, которые способствуют задержке эвакуации желудка. Следует также учитывать, что всасывание аминокислот замедляется при наличии в кишечном содержимом фруктозы и галактозы. Приведенные выше данные могут быть, однако, использованы для ориентировочной оценки скорости переваривания принятого с пищей белка и всасывания аминокислот.

Всасывание аминокислот происходит главным образом в тонком кишечнике и является активным, требующим энергии процессом, сходным в ряде отношений с активным транспортом глюкозы (разд. 11.3.2.1). Подобно последнему, транспорт аминокислот в клетки зависит от содержания Na^+ . Специфические системы транспорта аминокислот были охарактеризованы при исследовании

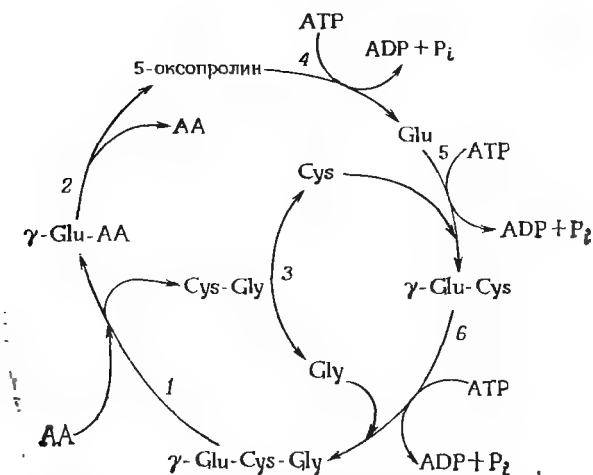
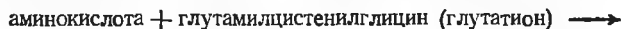


Рис. 21.1. γ -Глутамильный цикл. Аминокислота (AA) входит в клетку в результате реакции 1, последующие реакции происходят внутри клетки. 1 — γ -глутамилтрансфераза; 2 — γ -глутамилциклотрансфераза; 3 — пептидаза; 4 — 5-оксипролин-иаза; 5 — глутамилцистеин-синтетаза; 6 — глутатион-синтетаза.

различных изолированных клеток и тканевых препаратов, а также в опытах *in vivo*. Полученные данные указывают на наличие пяти или более специфических транспортных систем, каждая из которых функционирует при переносе определенной группы близких по строению аминокислот: 1) нейтральных аминокислот с небольшой боковой цепью, 2) нейтральных аминокислот с объемистой боковой цепью, 3) основных аминокислот, 4) кислых аминокислот и 5) пролина. Аминокислоты конкурируют друг с другом за соответствующие участки связывания. Так, всасывание лейцина (если он присутствует в относительно высоких концентрациях) уменьшает всасывание изолейцина и валина.

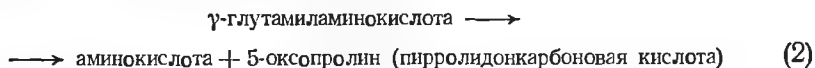
Были получены данные о механизме транспорта некоторых аминокислот в клетки и о функционировании этой системы транспорта в кишечнике, мозге и почках. Рассматриваемый механизм получил название *γ -глутамильного цикла*; в нем участвуют шесть ферментов, один из которых является мембранно-связанным, а остальные находятся в цитозоле. В цикле участвует трипептид глутатион — γ -глутамилцистеинилглицин (разд. 22.1.2), который имеется во всех тканях животных; концентрация его составляет около 5 мМ.

При функционировании γ -глутамильного цикла (рис. 21.1) ключевую роль играет мембранно-связанный фермент γ -глутамилтрансфераза, которая катализирует следующую реакцию:



(1)

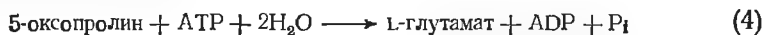
В результате реакции происходит перенос глутамильного остатка глутатиона на транспортируемую аминокислоту. В качестве доноров γ -глутамильной группы в реакции (1) могут выступать также другие γ -глутамилпептиды, а все обычные аминокислоты, за исключением пролина, могут функционировать как акцепторы. Свободная аминокислота, участвующая в рассматриваемой реакции, поступает с наружной стороны клетки; глутатион находится внутри клетки. После осуществления реакции γ -глутамиламинокислота оказывается в клетке вместе с цистеинилглицином. На следующей стадии γ -глутамиламинокислота расщепляется в результате реакции, катализируемой γ -глутамилциклотрансферазой — ферментом, находящимся в цитозоле:



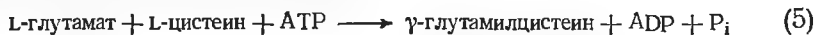
Образующийся на первой стадии цистеинилглицин, как предполагают, подвергается гидролизу *пептидазой*:



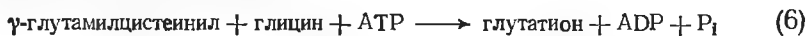
В результате этих трех последовательных реакций происходит перенос одной молекулы аминокислоты в клетку, при этом используется энергия гидролиза пептидных связей глутатиона. Для продолжения процесса глутатион должен быть регенерирован. Это осуществляется в результате трех последовательных реакций. В первой из них 5-оксопролин превращается в L-глутамат ферментом *5-оксопролиназой*:



Реакция L-глутамата с L-цистеином катализируется γ -глутамилцистеин-синтазой (разд. 22.1.1):



В завершающей реакции цикла синтез глутатиона катализируется глутатион-синтазой:



Теперь глутатион может участвовать в следующем цикле с другой аминокислотой. Таким образом, для транспорта в клетку каждой молекулы аминокислоты используются три концевые фосфатные связи АТФ.

Все ферменты γ -глутамильного цикла обнаружены в высоких концентрациях в ряде тканей, осуществляющих активный транспорт аминокислот. Ключевой фермент цикла γ -глутамилтрансфераза в больших количествах обнаружен в почках, эпителии ворси-

нок тонкого кишечника, сосудистом сплетении, слюнных железах, желчном протоке, семенных пузырьках, эпидидимусе и в ресничном теле. Фермент из почек крысы был получен в высокоочищенном (вероятно, гомогенном) состоянии; кинетические исследования позволяют предполагать, что при функционировании фермента в качестве промежуточного соединения образуется фермент γ -глутамил. Широкое распространение глутатиона в тканях было отмечено выше.

Имеющиеся экспериментальные данные позволяют считать, что транспорт ряда аминокислот осуществляется с помощью γ -глутамильного цикла. Следует, однако, подчеркнуть, что этот механизм является, вероятно, только одним из нескольких механизмов, обеспечивающих транспорт аминокислот в клетки. В пользу такого представления говорит относительно узкая специфичность ферментов рассматриваемого цикла по отношению к аминокислотам. Так, γ -глутамилтранспептидаза более активна по отношению к глутамину, цистину и другим нейтральным аминокислотам и менее активна по отношению к аспартату и ряду разветвленных и ароматических аминокислот. Пролин не является субстратом этого фермента и поэтому должен транспортироваться другой системой.

Описано врожденное заболевание человека, связанное с отсутствием фермента 5-оксипролиназы [см. реакцию (4)]; при этом с мочой выделяется 5-оксипролин. У лиц с этим заболеванием наблюдается нарушение транспорта и метаболизма аминокислот. Можно также отметить, что Na^+ , необходимый для транспорта аминокислот (см. этот раздел), необходим также для оптимальной активности γ -глутамилтрансферазы.

Остающиеся непрогидролизованными небольшие пептиды обычно составляют весьма незначительную долю продуктов переваривания белка; они также могут всасываться из кишечника. В период переваривания белков и всасывания продуктов гидролиза содержание пептидного азота крови повышается. Иногда через слизистую кишечника в кровь могут проникать нативные белки. Проницаемость слизистой кишечника у новорожденных большинства видов млекопитающих выше, чем у взрослых особей; поэтому в кровь могут проходить антитела молозива молока (гл. 30). Этому благоприятствует наличие в молозиве белка, являющегося мощным ингибитором трипсина. Благодаря этим факторам, а также низкой концентрации протеолитических ферментов в пищеварительных соках новорожденных в их кишечнике может происходить всасывание некоторого количества нативных белков, достаточного для возникновения сенсибилизации организма. Это, возможно, является причиной наблюдаемой иногда индиосинкразии к белкам пищи, например молока и яиц.

Всасываемые в кишечнике аминокислоты попадают в портальную систему и, следовательно, в печень.

21.2.1. Переход аминокислот из системы циркуляции в ткани

Концентрация аминокислот в плазме составляет в норме (в расчете на аминокислот) 4—8 мг на 100 мл (35—65 мг смеси аминокислот, см. табл. 29.1). Аминокислоты, поступающие в систему циркуляции в результате всасывания из кишечника или внутривенного введения, быстро удаляются из нее и оказываются во всех тканях и органах тела. Так, после внутривенного введения большого количества аминокислоты (5—10 г) 85—100% ее может оказаться в тканях уже через 5 мин.

Наибольшей способностью поглощать циркулирующие аминокислоты обладает печень, весьма активны в этом отношении также почки; менее активны другие ткани. Некоторые ткани, особенно мозг, поглощают аминокислоты избирательно. Так, после внутривенного введения метионин, гистидин, глицин, аргинин, глутамин и тирозин быстро появляются в мозге; глутаминовая кислота появляется в нем несколько медленнее, а лизин, пролин и лейцин — очень медленно. Скорости поступления в мозг последних трех аминокислот более высоки у молодых животных.

21.3. Незаменимые для человека аминокислоты

В ходе эволюции животных организм утратил способность синтезировать углеродные цепи ряда α -кетокислот, соответствующих аминокислотам, входящим в состав большинства белков. Аминокислоты, которые не могут синтезироваться в организме со скоростью, достаточной для обеспечения потребностей метаболизма, были названы *незаменимыми* аминокислотами. Незаменимые аминокислоты приведены в табл. 21.1; в этой таблице приведены также заменимые аминокислоты, т. е. те, которые не обязательно должны иметься в пище. Отнесение аминокислот к незаменимым

Таблица 21.1

Классификация аминокислот по их влиянию на рост белых крыс

Незаменимые	Заменимые
Аргинин ^a , гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, валин	Алапин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, пролин, серин, тирозин

^a Аргинин может синтезироваться в организме крысы, но недостаточно быстро, чтобы обеспечить возможность *нормального* роста.

или заменимым основывалось первоначально на результатах опытов, проведенных на белых крысах, однако в дальнейшем были учтены результаты исследований азотистого баланса (разд. 11.4) у детей и подростков.

Термины *незаменимые* и *заменимые* аминокислоты базируются в основном на результатах экспериментов, проведенных в лабораторных (искусственных) условиях. Фактически приведенное в таблице разделение аминокислот является их классификацией; при этом дифференцирующим признаком является способность (или неспособность) организма человека или других животных синтезировать *de novo* углеродные скелеты рассматриваемых аминокислот. Поэтому к числу незаменимых аминокислот следовало бы отнести тирозин и цистеин, поскольку тирозин образуется непосредственно из фенилаланина (разд. 21.4.2.4) в одну стадию, а при синтезе цистеина сера поступает только от метионина (см. ниже). Следовательно, ежедневная потребность в фенилаланине является в действительности суммарной потребностью в двух аминокислотах, фенилаланине и тирозине, аналогично потребность в метионине является суммарной потребностью в метионине и цистеине. Положение с аргинином является весьма неопределенным, поскольку, как будет показано дальше, эта аминокислота может синтезироваться в организме человека и других животных.

Список заменимых аминокислот оказывается относительно ограниченным. В их число входят: аланин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, которые могут образоваться в результате переаминирования (разд. 21.4.1) из α -кетокислот, функционирующих в цикле лимонной кислоты; пролин, образующийся из глутаминовой кислоты (разд. 21.4.2.5), серин (разд. 21.4.2.6), образующийся из промежуточного продукта гликолиза; глицин (разд. 21.4.2.7), синтезируемый из серина, и амиды аминокислот — глутамин и аспарагин, образующиеся соответственно из глутаминовой (разд. 21.4.3.2) и аспарагиновой (разд. 21.4.3.3) кислот.

Речь, следовательно, идет об аминокислотах, которые синтезируются относительно простыми путями и непосредственные предшественники которых всегда доступны в процессе метаболизма всех видов животных, включая млекопитающих. В то же время очевидно также, что эта группа аминокислот широко представлена в белках и они не могут отсутствовать в пище при потреблении обычных продуктов. Если, однако, специально исключить эти аминокислоты из экспериментальной диеты, то суммарная «потребность» в незаменимых аминокислотах несколько увеличится в связи с необходимостью обеспечить соответствующим количеством азота синтез «заменимых» аминокислот. Последствия потребления пищи, состоящей из природных продуктов с относительно низким содержанием лизина, триптофана или метионина, обсуждаются в гл. 49.

21.4. Метаболизм аминокислот в печени

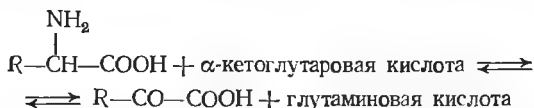
Печень является главным органом метаболизма аминокислот животных. Функционирование печени обеспечивает следующие процессы: 1) синтез собственных белков и ряда белков плазмы, а также гидролиз большинства из них (разд. 21.5.1); 2) синтез различных азотсодержащих соединений — пуринов, пиримидинов, мочевой кислоты, никотиновой кислоты и креатина; эти соединения или конечные продукты их метаболизма выводятся с мочой; 3) обеспечение (через кровь) других органов сбалансированной смесью аминокислот, необходимой для биосинтеза белков; 4) синтез заменимых аминокислот в требуемом размере и 5) необходимое перераспределение избыточных количеств потребленных с пищей углеродных цепей аминокислот и их азота.

Путь синтеза белка (процесс 1) описан в гл. 26. Скорость синтеза каждого белка и его гидролитической деполимеризации контролируется автономными механизмами.

Превращения, в результате которых в печени из аминокислот образуются различные азотсодержащие соединения (но не α -аминокислоты) (процесс 2), рассматриваются в гл. 23. Многие из этих превращений необратимы в том смысле, что в результате метаболизма аминокислот образуются продукты, которые не могут подвергаться дальнейшей деградации и экскретируются с мочой. Процессы 3, 4 и 5 рассматриваются в данной главе. Ведущую роль в этих процессах в большинстве случаев играет глутаминовая кислота.

21.4.1. Переаминирование

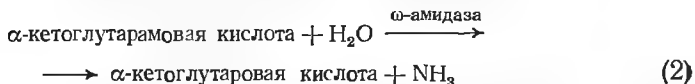
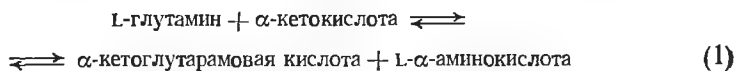
Процесс переаминирования, подробно описанный в предыдущей главе, первоначально был обнаружен в печени. Пиридоксальфосфатзависимый фермент, называемый аминотрансферазой, катализирует реакцию



В каждом случае одной из участвующих в реакции аминокислот является глутамат. Известно большое число аминотрансфераз; в название каждого фермента входят наименования двух участвующих в процессе аминокислот, например *тирозин-глутамат* — *аминотрансфераза*. Во многих случаях аминотрансферазы специфичны по отношению к одной сопряженной паре субстратов — α -кетоглутарат-*L*-глутамат; при этом специфичность ко второй сопряженной паре субстратов менее выражена. В таком случае в название фер-

мента включают наименование аминокислоты, по отношению к которой фермент наиболее активен. За исключением лизина и треонина, все аминокислоты могут участвовать в переаминировании. Трансаминазы имеются в печени, почках, мышцах и мозге; наибольшая активность приходится на долю аспартат- и аланин-аминотрансфераз.

Аспарагин и глутамин, амиды аминокислот, также участвуют в реакциях переаминирования. Продуктами, образующимися из этих аминокислот, являются соответственно α -кетосукциновая и α -кетоглутарамовая кислоты, ω -амиды соответствующих α -кетокислот. Специфические ω -амидазы катализируют реакции освобождения аммиака:



Таким образом, α -кетоглутарамат является нормальным компонентом тканей. При печеночной коме повышение уровня NH_3 в крови приводит к увеличению образования глутамина (см. ниже). В мозге активность глутамин-аминотрансферазы относительно высока по сравнению с активностью ω -амидазы; поэтому при печеночной коме в спинномозговой жидкости происходит накопление α -кетоглутарамовой кислоты. У тех пациентов, у которых нет сопутствующего поражения печени, концентрация этого амида в спинномозговой жидкости ниже, что отражает важную роль печени в осуществлении реакций, ведущих к переходу аммиака в состав мочевины — конечного продукта метаболизма азота у млекопитающих (см. ниже).

Было показано, что как в цитозоле, так и в митохондриях ряд аминотрансфераз, включая аспартат-, аланин- и глутамин-аминотрансферазу, а также ω -амидазы находятся в виде изоферментных форм. Эти изоферменты проявляют различные каталитические и физико-химические свойства и субстратную специфичность. Изоферменты аспартатаминотрансферазы из митохондрий и цитозоля сердца свиньи имеют $M \sim 90\,000$, состоят из двух субъединиц примерно одинакового размера, однако различаются изoeлектрическими точками и аминокислотной последовательностью. Цитозольные аминотрансферазы обычно более активны, чем митохондриальные. В результате реакции переаминирования в цитозоле происходит образование глутамата. Последний поступает в митохондрии, где он либо подвергается дезаминированию при участии глутаматдегидрогеназы (разд. 21.4.2.1), либо вступает в реакции переаминирования с шавелевоуксусной кислотой с образованием аспараги-

новой кислоты — донора аминокруппы при синтезе мочевины (разд. 21.4.3.4).

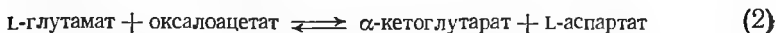
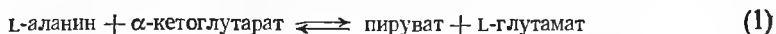
Константа равновесия для всех реакций переаминирования близка к 1. Следовательно, эти реакции не могут определять направление метаболических процессов. Ферменты переаминирования функционируют постоянно. Определенное направление процесс приобретает только при удалении из системы одного или более продуктов. Например, в простейшем случае в результате окисления глутамата, приводящего к образованию α -кетоглутарата и NH_3 (см. ниже), и последующего превращения NH_3 в мочевины в конечном счете происходит удаление α -аминоазота донорных аминокислот и превращение последних в α -кетокислоты, которые могут служить субстратами для других ферментов клетки. В другом случае, когда, например, животное находится на диете, содержащей только незаменимые аминокислоты, в результате действия соответствующих аминотрансфераз в условиях постоянного наличия во всех клетках оксалоацетата и пирувата (в результате функционирования гликолиза и цикла лимонной кислоты) будет происходить образование аспарагиновой кислоты и аланина; далее они будут либо использоваться для синтеза белка, либо поступать в систему циркуляции.

Если даже смесь поступающих с пищей аминокислот является оптимальной (такая смесь, однако, не описана), постоянно функционирующие аминотрансферазы приводят к быстрому обмену аминокрупп между аминокислотами, для которых имеются соответствующие трансферазы. О закономерности этого процесса свидетельствуют следующие данные: после введения аминокислоты, меченной ^{15}N по α -аминогруппе, метка ^{15}N быстро появляется в α -аминогруппах всех аминокислот, находящихся в печени, за исключением лизина и треонина.

Реальная скорость каждой из аминотрансферазных реакций в клетке определяется (как и в общем случае) только концентрациями субстратов и количеством соответствующего фермента; на концентрацию и активность специфических аминотрансфераз в печени сильное влияние могут оказывать некоторые гормоны. Так, скорость синтеза тирозинаминотрансферазы в печени может специфически увеличиваться после инъекции кортикостероидов (гл. 45), инсулина (гл. 46), глюкагона (гл. 46) или циклического АМР. Наоборот, введение крысам норадреналина (гл. 45) снижает повышенную активность тирозинаминотрансферазы, наблюдаемую при увеличении количества получаемого животными пиридоксина — кофактора фермента.

Процесс переаминирования обеспечивает перераспределение аминного азота. Это весьма важно, поскольку получаемая животными пища может служить источником такой смеси аминокислот, которая существенно отличается от оптимальной для метаболизма. Если, например, пища богата аланином и бедна аспарагиновой

кислотой, то следующая пара реакций могла бы поставить азот, необходимый для образования аспарагиновой кислоты:



21.4.2. Образование в ходе метаболизма заменимых аминокислот

Образование в организме животного заменимых аминокислот из доступных соединений оказывается возможным в результате весьма простых метаболических реакций. Следует, однако, иметь в виду, что в обычных условиях животные, получающие с белками незаменимые аминокислоты, обеспечиваются одновременно также и заменимыми аминокислотами, и поэтому не возникает необходимости синтеза последних.

21.4.2.1. Глутаминовая кислота

Наличие в метаболическом пуле α -кетоглутарата и высокая активность описанных выше обратимо действующих аминотрансфераз обеспечивают образование необходимого количества глутамата. Эта аминокислота образуется также в ходе метаболизма гистидина (рис. 23.12), пролина (разд. 23.2.2), 5-оксопролина (рис. 23.1), орнитина (разд. 23.2.2) и глутамина (разд. 23.2.3). Эти источники следует, однако, рассматривать как «кажущиеся», поскольку все перечисленные аминокислоты в свою очередь первоначально синтезировались из глутамата. Имеются также дополнительные источники глутамата, а именно восстановительное аминирование α -кетоглутарата, катализируемое *глутаматдегидрогеназой* (разд. 21.4.3.1), и глутаматсинтазная реакция (разд. 20.2.2). Эти процессы, приводящие к образованию глутамата, являются центральным звеном в метаболизме азота растений и микроорганизмов. Хотя они осуществляются также и у животных, однако в этом случае речь идет о «мнимом» источнике глутамата. Используемый для синтеза аммиак образуется преимущественно либо в результате противоположного процесса (т. е. окислительного дезаминирования глутамата, разд. 21.4.3.1), либо в результате гидролиза глутамина, а последний в свою очередь образуется из глутамата. Следовательно, хотя рассмотренные реакции и протекают у млекопитающих, их нельзя рассматривать как эквивалентные синтезу глутамата в растениях; по-видимому, метаболически эквивалентным следует считать процесс переаминирования.

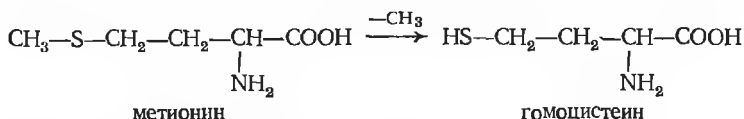
21.4.2.2. Аспарагиновая кислота и аланин

По-видимому, никогда не ощущается недостатка в этих двух аминокислотах; они образуются непосредственно из оксалоацетата и пирувата соответственно в результате переаминирования с глутаматом.

21.4.2.3. Цистеин

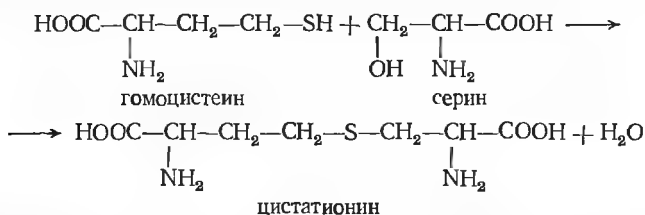
Источником атома серы цистеина может служить только незаменимая аминокислота метионин. Если организм получает достаточное количество метионина, то не возникает дополнительной потребности в цистеине. Реакции биосинтеза цистеина (все они протекают в печени) следующие:

1. Деметилирование метионина в гомоцистеин (гомолог цистеина):

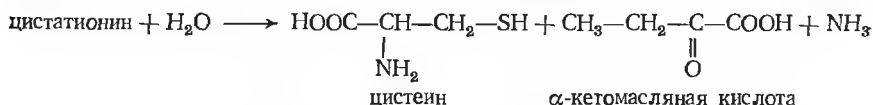


Деметилирование метионина будет рассмотрено также позднее в связи с процессом переметилирования.

2. Гомоцистеин конденсируется с серином в реакции, катализируемой пиридоксальфосфатзависимым ферментом *цистатионин-β-синтазой*; продуктом реакции является цистатионин:



3. Расщепление цистатионина катализируется *цистатионин-γ-лиазой*, также являющейся пиридоксальфосфатзависимым ферментом:



Суммарным результатом приведенных выше реакций является замена гидроксидной группы серина на сульфгидрильную группу гомоцистеина. Таким образом, углеродная цепь и аминогруппа цистеина имеют источником серин, а сера поставляется метионином.

Цистеин является аллостерическим ингибитором цистатионин- γ -лиазы; он подавляет также синтез цистатионин- β -синтазы. Это обстоятельство позволяет объяснить уменьшение потребности в метионине для растущих крыс, находящихся на синтетической диете, содержащей достаточное количество цистеина (или цистина). На такой диете потребность в метионине оказывается сниженной более чем в два раза по сравнению с потребностью при нахождении на диете, не содержащей цистеина. Подавление последним синтеза цистатионин- β -синтазы в печени должно замедлять превращение гомоцистеина в цистатионин.

Цистатионин является ключевым промежуточным продуктом в приведенных выше реакциях; у млекопитающих его единственная функция заключается в выполнении роли промежуточного продукта при переносе серы от метионина на цистеин. Остается неясным, какую роль играет цистатионин в мозге, где он находится в высокой концентрации (гл. 37). Недостаток цистатионазы является наследственным заболеванием (разд. 23.2.7.3), он проявляется в задержке умственного развития. Непользованный в ходе метаболизма гомоцистеин экскретируется с мочой в виде гомоцистина; это состояние называют *гомоцистинурией* (разд. 23.2.7.3). При другом наследственном заболевании с мочой экскретируется цистатионин; это состояние называют *цистатионинурией* (разд. 23.2.7.3).

Хотя метаболическая равноценность цистеина и цистина установлена, в тканях млекопитающих не найдено системы, катализирующей их взаимопревращение. NAD-зависимая *цистинредуктаза* имеется в дрожжах и высших растениях. Как описано ниже, восстановленный глутатион может неферментативно восстанавливать цистин в цистеин.

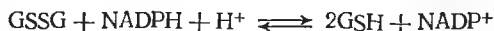
Свободный цистин в клетках имеется либо в незначительном количестве, либо он вообще отсутствует. Цистиновые остатки в белках образуются в результате окисления цистеиновых остатков после включения последних в состав полипептидных цепей. Однако в присутствии O_2 и таких катионов, как Fe^{2+} или Cu^{2+} , цистин может образовываться из цистеина неферментативным путем. Если это происходит, обратный процесс может осуществляться при участии *глутатионредуктазы*. Глутатион, представляющий собой γ -глутамилцистеинилглицин (GSH), реагирует неферментативно с различными дисульфидами, например цистином, с образованием смешанного дисульфида.



Затем вторая молекула глутатиона реагирует со смешанным дисульфидом, образуя окисленный глутатион (GSSG)



Глутатионредуктаза является флавопротеидом, она катализирует реакцию



Таким образом, если происходит образование цистина ($\text{R}'\text{SSR}''$ в приведенных выше реакциях), он может быть вновь восстановлен в цистеин и использоваться клеткой.

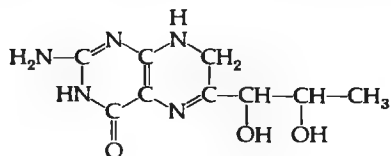
21.4.2.4. Тирозин

Биосинтез тирозина у млекопитающих происходит путем гидроксирования незаменимой аминокислоты фенилаланина. Значительная доля потребности в фенилаланине в действительности обусловлена использованием его для синтеза тирозина. При введении последнего в диету потребность в фенилаланине значительно снижается. В этом смысле тирозин находится в таком же положении по отношению к фенилаланину, как цистеин к метионину. В условиях нормального метаболизма единственно известная роль фенилаланина, помимо его использования для синтеза белка, — это превращение в тирозин.

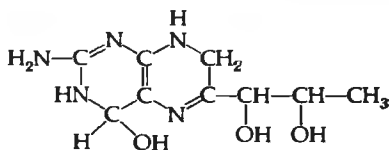
Фенилаланин-гидроксилазная система (фенилаланин-4-монооксигеназа) печени млекопитающих является оксигеназой со смешанной функцией (разд. 13.5.5.4); при осуществлении двухстадийной реакции она использует NADPH и донор электронов тетрагидробиоптерин, — восстановленное производное известная роль фенилаланина, помимо его использования для синтеза белка, — это сходство с фолиевой кислотой (разд. 21.4.2.8).



Реакция (1) катализируется фенилаланин-гидроксилазой, а реакция (2) — дигидротетридин-редуктазой. Последняя реакция позволяет повторно использовать кофермент, который в итоге переносит восстанавливающие эквиваленты от NADPH (донора электронов) к акцептору электронов — одному из атомов кислорода O_2 .



дигидробиоптерин



тетрагидробиоптерин

Фенилаланин-гидроксилаза печени крысы сильно активируется в присутствии фосфоглицеридов, а также в результате ограниченного протеолиза. Активность крысиной фенилаланин-гидроксилазы регулируется механизмом, включающим фосфорилирование и дефосфорилирование фермента; эти реакции катализируются соответственно с АМР-зависимой протеинкиназой и фосфопротенин-фосфатазой.

Врожденное отсутствие фенилаланин-гидроксилазы приводит к фенилкетонурии. Носителем рецессивного гена у европейцев является (приблизительно) 1 из 80 человек. В отсутствие этого фермента становятся выраженными минорные пути метаболизма фенилаланина, мало используемые у здоровых людей. В результате переаминирования из фенилаланина образуется фенилпировиноградная кислота; последняя экскретируется с мочой в количестве, достигающем 1—2 г/сут. У детей, страдающих фенилкетонурией, рано отмечаются признаки выраженной умственной отсталости; ограничение количества фенилаланина в диете таких детей снижает уровень фенилаланина в крови, прекращает экскрецию фенилпировиноградной кислоты и в значительной степени предотвращает развитие умственной отсталости. Накопление фенилпировиноградной кислоты приводит к образованию и экскреции с мочой фенилмолочной кислоты, о-оксифенилмолочной кислоты и фенилукусусной кислоты; последняя экскретируется в составе фенилацетилглутамина (разд. 20.3.2).

21.4.2.5. Пролин и орнитин

Глутаминовая кислота является предшественником для синтеза *пролина* и *орнитина*. Последний не входит в состав белков, но является предшественником аргинина (см. ниже). 5-Углеродная цепь глутаминовой кислоты превращается в γ -глутамилфосфат, который восстанавливается в глутамилполуальдегид. В результате переаминирования из последнего образуется орнитин; если же происходит замыкание кольца, то образуется Δ^1 -пирролин-5-карбоновая кислота. При восстановлении последней с помощью NADH образуется пролин. Последовательность реакций приведена на рис. 20.4.

21.4.2.6. Серин

Углеродная цепь серина поставляется образующейся в ходе гликолиза 3-фосфоглицериновой кислотой. Последняя окисляется в 3-фосфоокси- в ходе NAD-зависимой реакции, катализируемой *3-фосфоглицератдегидрогеназой*. В результате переаминирования с глутаматом образуется 3-фосфосерин; после гидролиза *серинфосфатазой* освобождается серин. 3-Фосфоглицератдегидрогеназа и серинфосфатаза ингибируются серином; это обеспечивает

регуляцию образования серина. Последовательность реакций приведена на схеме (разд. 20.3.2.3). Серин может также образоваться из глицина (см. ниже).

Рассмотренные выше ферменты биосинтеза серина, а именно дегидрогеназа, аминотрансфераза и фосфатаза находятся под гормональным контролем. Введение тестостерона (гл. 44) значительно увеличивает активность этих ферментов в печени, почках и предстательной железе. Активность трансаминазы печени увеличивается после введения кортикостероидов (гл. 45). Различные метаболические функции серина (гл. 23), а также его роль как первичного источника одноуглеродных единиц (см. ниже) значительно повышают роль механизмов, регулирующих синтез серина.

21.4.2.7. Глицин

Главным источником глицина является серин; в реакции, катализируемой пиридоксальфосфатзависимой *серин-трансоксиметилазой*, происходит перенос β -углеродного атома серина на тетрагидрофолат (см. ниже).

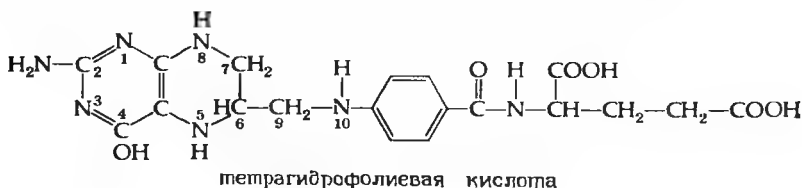


Поскольку эта реакция обратима, она обеспечивает дополнительный путь биосинтеза серина.

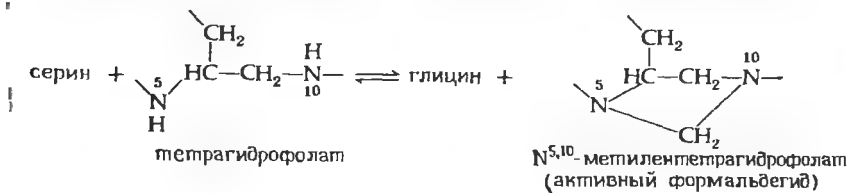
Серин является *первичным* источником одноуглеродных единиц (см. ниже). Дополнительным источником служит α -углеродный атом глицина (реакция катализируется *глицин-синтазой*, разд. 23.2.6). Значение этого последнего источника как донора одноуглеродных единиц не установлено.

21.4.2.8. C₁-группы

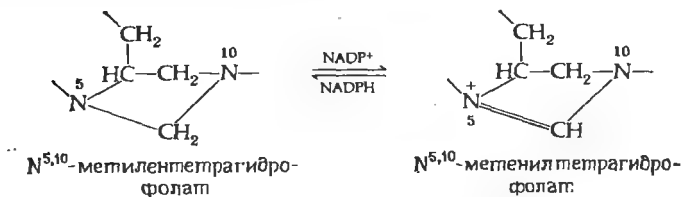
В рассмотренном выше превращении серина в глицин акцептором β -углеродного атома серина служит тетрагидрофолиевая кислота. Последняя является метаболически важной формой витамина — фолиевой кислоты (гл. 50), которая функционирует как переносчик C₁-групп. Фолат восстанавливается в форму кофермента (тетрагидрофолат) в реакции, катализируемой *дигидрофолат-редуктазой*. Фермент из бактериальных источников, по-видимому, имеет $M \sim 15\,000$ — $18\,000$, а из печени млекопитающих (бык) M 22 000. Кофактором обоих ферментов является NADPH.



В последующих превращениях участвуют атомы азота в 5- и 10-положениях. При образовании глицина схема реакции следующая:

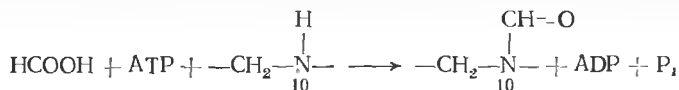


По-видимому, перед переносом β -углерода серина на тетрагидрофолат H_2N -группа аминокислоты связывается в активном центре с пиридоксальфосфатом в виде шиффова основания; после переноса одноуглеродного фрагмента происходит гидролиз шиффова основания, в результате освобождается глицин. $\text{N}^{5,10}$ -метилентетрагидрофолевая кислота может окисляться NADP^+ с образованием $\text{N}^{5,10}$ -метенилтетрагидрофолата; реакция катализируется $\text{N}^{5,10}$ -метилентетрагидрофолат-дегидрогеназой.



При гидролизе $\text{N}^{5,10}$ -метенилтетрагидрофолата образуется N^{10} -формилтетрагидрофолат, который является донором формильной группы во многих реакциях биосинтеза. Обратимая реакция гидролиза катализируется $\text{N}^{5,10}$ -метенилтетрагидрофолатциклогидролазой.

N^{10} -Формилтетрагидрофолат может образоваться также непосредственно из муравьиной кислоты за счет гидролиза АТФ в реакции, катализируемой *формилтетрагидрофолат-синтетазой*:



Фермент, катализирующий эту реакцию, обнаружен в печени голюба, в эритроцитах человека, а также у микроорганизмов. Эта реакция объясняет, каким образом углерод введенной в организм H^{14}COOH появляется в соединениях, образующихся из N^{10} -формилтетрагидрофолата.

гут быть выделены в индивидуальном состоянии из бактериальных источников. Однако показано, что в печени овцы эти три фермент-состоит из двух, по-видимому, идентичных субъединиц. Предполагаемые активности принадлежат одному белку; он имеет $M\ 213\ 000$ и дается, что у дрожжей эти три ферментные активности также принадлежат одному структурному комплексу, поскольку мутации приводят либо к утрате, либо сильному снижению всех трех видов активности.

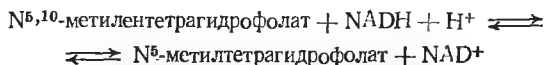
Другой ферментный комплекс был выделен из печени свиньи; он состоит из субъединиц одного типа и, по-видимому, катализирует две реакции: перенос форминогруппы с форминоглутамата (рис. 21.2, реакция 2) и формиминотетрагидрофолат-циклодезаминазную реакцию (рис. 21.2, реакция 3).

Как было отмечено выше (разд. 21.4.28), первичным источником одноуглеродных единиц является серин (см. реакцию, катализируемую серин-трансоксиметилазой, разд. 21.4.27). В печени крысы этот фермент распределен примерно поровну (в виде соответствующих изоферментов) между митохондриями и цитозолем. Фолат и тетрагидрофолат находятся как в митохондриях, так и в цитозоле, однако переноса фолата через внутреннюю мембрану митондрий, по-видимому, не происходит. В то же время глицин и серин, вероятно, легко транспортируются через эту мембрану. Поскольку серин-трансоксиметил — трансферазы митохондрий и цитозоля катализируют перенос одноуглеродных единиц, было высказано предположение, что они обеспечивают перенос этих единиц через внутреннюю митохондриальную мембрану, создавая *челночный механизм* переноса. Его можно сопоставить с другими челночными механизмами переноса через внутреннюю митохондриальную мембрану, например с механизмом переноса восстанавливающих эквивалентов, осуществляемым цитоплазматическим и митохондриальным изоферментами малатдегидрогеназы.

Тесное переплетение метаболических реакций, в которых участвуют производные тетрагидрофолиевой кислоты (рис. 21.2), осуществляется также в ряде других рассматриваемых ниже метаболических процессов и в ходе метаболизма пуринов и пиримидинов (гл. 24); это свидетельствует о биологической важности фермента дигидрофолат-редуктазы. Активность этого фермента является определяющим фактором, обеспечивающим образование достаточных количеств ключевого носителя одноуглеродных единиц — тетрагидрофолиевой кислоты. В связи с этим важным обстоятельством является сильное и специфическое конкурентное ингибирование этого фермента структурными аналогами его субстрата (дигидрофолиевая кислота); эти ингибиторы образуют группу антагонистов фолиевой кислоты (антифолиевые агенты), которая находит применение в клинике для ограничения быстрой пролиферации определенных типов опухолевых клеток (разд. 8.6).

21.4.2.9. Происхождение метильных групп

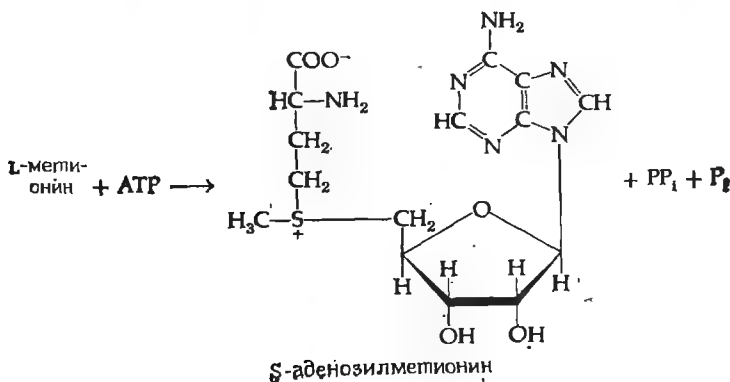
Метиленовая группа N^{5,10}-метилентетрагидроfolата является источником метильных групп при синтезе как метионина, так и тимина. Восстановление N^{5,10}-метилентетрагидроfolата катализируется флавопротеидом — N^{5,10}-метилентетрагидроfolат-редуктазой (реакция 11, рис. 21.2)



Образование N⁵-метилтетрагидроfolата в приведенной выше реакции обеспечивает путь образования *de novo* метильных групп не только метионина и тимина, но также и ряда других соединений, например холина, саркозина и диметилглицина. При синтезе этих соединений происходит перенос метильной группы от N⁵-метилтетрагидроfolата. Роль кобамида и механизм этого трансметилирования рассмотрены в гл. 50 (см. витамин B₁₂).

21.4.2.10. Переметилирование

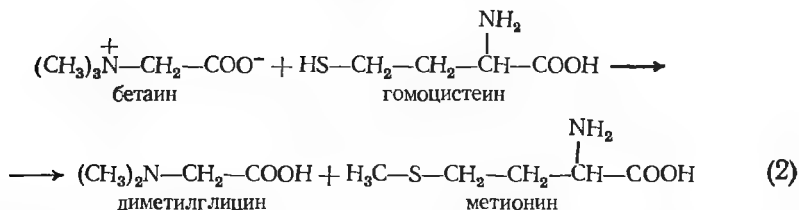
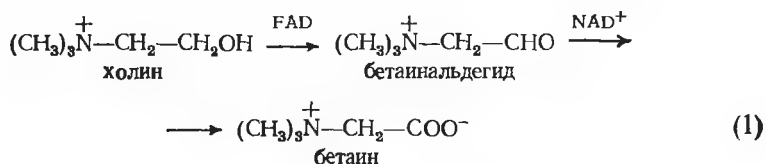
Перенос метильной группы метионина на соответствующие акцепторы в ходе реакции, называемой *трансметилированием*, имеет важное метаболическое значение. При деметилировании метионина образуется гомоцистеин. Активной формой метионина, которая функционирует в реакциях метилирования, является S-аденозилметионин



— сульфониевая форма метионина, свободная энергия расщепления которой сравнима со свободной энергией гидролиза АТФ. Синтез S-аденозилметионина катализируется *метионин-аденозилтрансферазой*, широко распространенным ферментом, который был выделен в очищенном виде из печени. Эта синтетическая реакция

уникальна для биологических систем, поскольку она является единственной известной реакцией, в результате которой освобождаются все три фосфата АТР (в виде фосфата и пирофосфата). Детальный химический механизм реакции не выяснен. Соответствующими специфическими *метилтрансферазами* (*метилферазами*) метильная группа S-аденозилметионина может быть перенесена, например, на гуанидиноуксусную кислоту с образованием креатина, на фосфатидилэтаноламин с образованием фосфатидилхолина или на амид никотиновой кислоты с образованием N¹-метилникотинамида (гл. 50). В каждом случае другим продуктом, образующимся из S-аденозилметионина, является S-аденозил-L-гомоцистеин, который далее расщепляется на аденозин и гомоцистеин (рис. 23.3).

У растений (которые способны образовывать гомоцистеин *de novo*) метионин синтезируется путем метилирования гомоцистеина за счет метильных групп, образующихся *de novo*. У животных может осуществляться следующий путь образования метионина. Холин, освобождающийся из фосфатидилхолина, окисляется в две стадии до бетаина; затем происходит трансметилирование на гомоцистеин с образованием метионина:



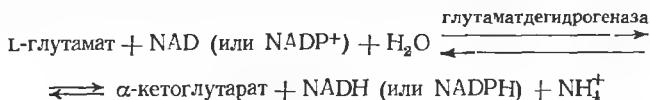
Если держать крыс на диете, лишенной метионина, но добавлять к ней гомоцистеин (в виде гомоцистина), то в результате осуществления приведенных выше процессов метилирования гомоцистеина образуется достаточное для нормального роста количество метионина. Следует отметить, что обычная диета не содержит гомоцистеина и что гомоцистеин, образующийся при переметилировании, используется в основном для синтеза цистеина; гомоцистеин, однако, может образоваться из S-аденозилгомоцистеина — продукта метаболизма метионина. В заключение следует подчеркнуть, что метионин является у животных главным источником метильных групп, которые в свою очередь поступают преимущественно от серина через N⁵, 10-метилтетрагидрофолат.

21.4.3. Метаболизм аммиака

Равновесная концентрация аммиака в печени чрезвычайно мала; он является, однако, важнейшим метаболитом, образующимся в результате одной главной и нескольких минорных реакций и претерпевающим дальнейшие превращения по тем же трем основным путям, которые функционируют у растений и микроорганизмов (гл. 20).

21.4.3.1. Источники NH_3

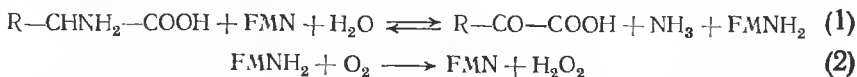
Основным источником NH_3 является окисление глутамата глутаматдегидрогеназой, находящейся как в митохондриях, так и в цитозоле печени (а также и в других тканях).



Глутаматдегидрогеназа печени (M 336 000) состоит из шести идентичных субъединиц с известной аминокислотной последовательностью. Фермент млекопитающих может использовать любой из пиридиннуклеотидов; он является также аллостерическим ферментом, стимулируемым ADP и GDP и ингибируемым ATP, GTP и пиридоксаль-5'-фосфатом. Каждая субъединица содержит отдельные связывающие участки для субстрата, кофермента, а также для пуриннуклеозидных эффекторов, которые влияют на активность фермента.

В печени глутаминовая кислота является главным продуктом переаминирования — основного механизма удаления аминогрупп аминокислот; глутаматдегидрогеназа же выполняет ключевую роль, катализируя освобождение (в виде ионов NH_4^+) аминогрупп, поступивших от других аминокислот.

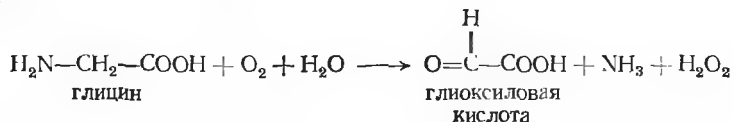
Окислительное дезаминирование аминокислот. Этот процесс обеспечивает дополнительный, по-видимому, минорный путь освобождения NH_3 из аминокислот. В печени и почках имеется неспецифическая *оксидоза* L-аминокислот, обладающая, однако, низкой активностью, ее простетической группой является FMN. Общая схема реакции следующая:



Образующийся пероксид разлагается *каталазой* (разд. 13.7.6), находящейся в пероксисомах. Простетической группой оксидаз L-аминокислот яда змей и некоторых микроорганизмов является FAD. Оксидазы L-аминокислот катализируют окисление всех

обычно встречающихся аминокислот, за исключением серина, треонина и дикарбоновых аминокислот.

Роль высокоактивной *оксидазы D-аминокислот* в печени и почках остается загадочной. Этот цитоплазматический фермент (разд. 13.2 и 13.6.1) имеет в качестве простетической группы FAD, он находится в пероксисомах почек, мозга и печени. Фермент катализирует окисление неприродных D-изомеров большого числа аминокислот; не имеется, однако, данных о том, что D-аминокислоты участвуют в метаболизме млекопитающих. Этот фермент мог бы обеспечивать окисление D-аминокислот клеточных стенок бактерий, если бы происходило всасывание этих аминокислот из кишечника. Оксидаза D-аминокислот играет, возможно, определенную роль, катализируя окисление глицина, который является для нее хорошим субстратом:



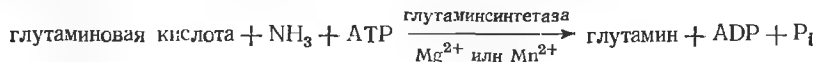
В печени обнаружены также активные моноамино- и диаминооксидазы. Эти флавопротеидные ферменты катализируют аэробное окисление различных физиологически важных аминов, например норадrenalина и дофамина (гл. 45), до соответствующих альдегидов и NH_3 . Хотя количество каждого из отдельных аминов невелико, суммарный эффект действия аминоксидаз может вносить значительный вклад в пул аммиака.

Неокислительное дезаминирование аминокислот. Группа пиридоксальфосфатзависимых дегидратаз катализирует удаление аминогрупп серина, цистеина, гомосерина, треонина и, возможно, гомоцистеина (гл. 23); во всех случаях образуются NH_3 и соответствующая кетокислота. Весьма необычным является результат действия дегидратазы на гистидин; при этом наряду с освобождением аммиака образуется соответствующая акриловая кислота. Другие примеры неокислительного удаления аминогрупп аминокислот приведены в гл. 23.

21.4.3.2. Фиксация аммиака

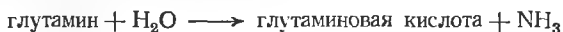
Образовавшийся NH_3 может далее участвовать в трех основных реакциях. В цитозоле печени за счет NH_3 возможно образование глутаминовой кислоты путем обращения глутаматдегидрогеназной реакции, поскольку NADPH цитозоля постоянно находится практически полностью в восстановленном состоянии. Размер синтеза глутамата (если он вообще происходит, особенно в условиях высокого уровня АТФ и GTP, проявляющих ингибирующее действие) неизвестен.

Основным путем фиксации NH_4^+ является синтез *глутамина*. Эта реакция катализируется в печени и мозге *глутаминсинтетазой* ($M\ 350\ 000$).



Реакция протекает в две стадии. Первая стадия, в которой участвуют глутамат и АТР, приводит к образованию активированного связанного с ферментом интермедиата, $\text{ADP-}\gamma\text{-глутамилфосфата}$. На второй стадии этот интермедиат реагирует с NH_3 ; в результате образуются глутамин, ADP и P_i . Глутаминсинтетаза тканей млекопитающих является октамером, состоящим из восьми идентичных субъединиц, и, по-видимому, ассоциирована с эндоплазматическим ретикулулом. Фермент из клеток животных значительно отличается от фермента микроорганизмов и, по-видимому, не подвергается сложной аллостерической регуляции, характерной для фермента из *E. coli* (разд. 20.2.2).

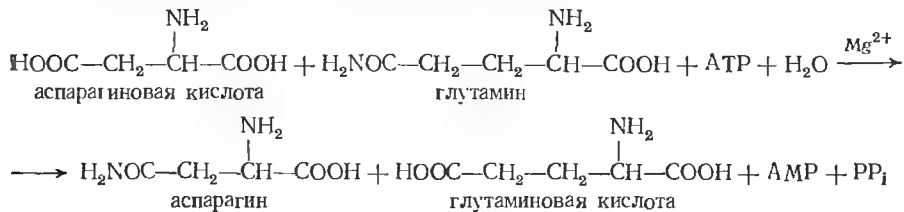
Глутамин непрерывно поступает из печени во все остальные органы, включая мозг. Гидролиз его осуществляется широко распространенной глутаминазой



Глутамин может использоваться не только для синтеза белка. Роль глутамина как эквивалента непротонированного NH_3 при осуществлении различных синтезов, а также как источника нетоксичной формы NH_3 позволяет рассматривать его как временное хранилище NH_3 .

21.4.3.3. Синтез аспарагина

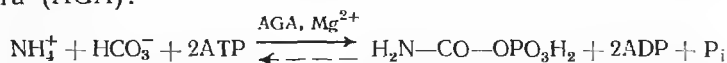
Синтез аспарагина в тканях млекопитающих катализируется *глутаминзависимой аспарагинсинтетазой*.



В приведенной выше реакции глутамин может быть заменен NH_3 . Соответствующий фермент называется глутамин-амидотрансферазой, по ряду свойств он сходен с глутаминзависимой карбамоил-фосфатсинтетазой (разд. 21.4.3.5) и NAD-синтетазой (разд. 24.1.9.2).

21.4.3.4. Синтез карбамоилфосфата

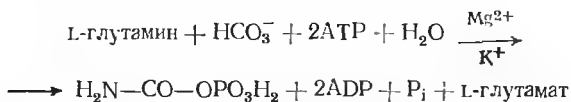
Третьим путем метаболизма NH_3 является синтез *карбамоилфосфата*, важного соединения для синтеза аргинина и пиримидинов. В печени млекопитающих имеются два различных фермента, катализирующих образование карбамоилфосфата, — *карбамоилфосфат-синтетаза I* и *карбамоилфосфат-синтетаза II*. Первый из них локализуется в митохондриях печени и, по-видимому, отсутствует в других тканях. Этот фермент использует в качестве донора азота только аммиак; необходимым положительным аллостерическим эффектором для фермента является N-ацетил-L-глутаминовая кислота (AGA).



Основной функцией фермента является поставка карбамоилфосфата для синтеза аргинина, а следовательно, и мочевины (разд. 21.4.4) — главного конечного продукта метаболизма азота млекопитающих. Исследование механизма реакции позволяет предполагать, что первая молекула АТР активирует бикарбонат, превращая его в связанный с ферментом карбоксифосфат. Этот комплекс реагирует с NH_4^+ , при этом образуется связанный с ферментом карбамат и освобождается фосфат. В результате реакции со второй молекулой АТР образуются карбамоилфосфат, АДР и освобождается фермент.

Регуляцию синтеза карбамоилфосфата можно рассматривать как осуществляющуюся по типу обратной связи, поскольку аргинин действует как отрицательный эффектор при образовании ацетилглутаминовой кислоты, которая является стимулятором образования карбамоилфосфата.

Карбамоилфосфат-синтетаза II, первоначально обнаруженная у бактерий, использует в качестве донора азота глутамин и не зависит от N-ацетилглутамата; она катализирует следующую реакцию:



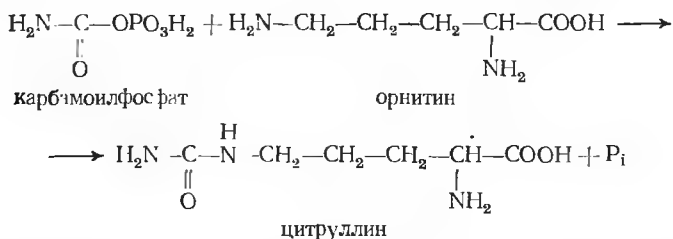
Этот фермент находится в цитоплазме клеток быстро растущих тканей, включая опухоли, и поставяет карбамоилфосфат для биосинтеза пиримидинов (разд. 24.1.5). Активность карбамоилфосфат-синтетазы II в ткани, по-видимому, пропорциональна скорости роста последней.

21.4.3.5. Синтез аргинина

Как отмечено выше, «фиксация» NH_3 в составе карбамоилфосфата является начальным этапом в серии реакций, ведущих через

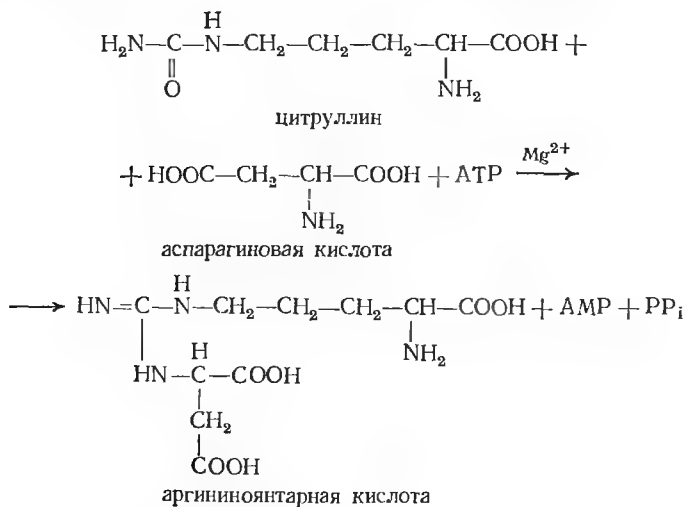
аргинин к конечному продукту метаболизма азота у млекопитающих, а именно к мочеvine.

На первой стадии синтеза аргинина, катализируемой *орнитин-транскарбамоилзой*, из карбамоилфосфата и орнитина образуется цитруллин:



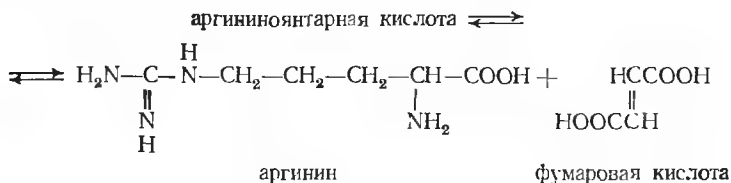
Транскарбамоилаза прочно ассоциирована с карбамоилфосфат-синтетазой I (см. выше) и, возможно, является частью общего с ней ферментного комплекса. Карбамоилфосфат-синтаза II сходным образом ассоциирована с аспартат-транскарбамоилазой в биосинтезе пиримидинов (разд. 24.1.5). Образование ферментами ассоциатов позволяет избежать гидролиза карбамоилфосфата, лабильного в свободном состоянии.

В результате следующей реакции, катализируемой *аргининосукцинат-синтетазой*, происходит конденсация цитруллина и аспарагиновой кислоты:



Аргининосукцинат-синтаза была получена в частично очищенном виде из печени млекопитающих. В опытах, в которых был ис-

пользован цитруллин, меченный ^{18}O по уреидной группе, было установлено, что происходит перенос меченного кислорода в освобождающийся АМР; это позволяет предполагать, что в ходе реакции образуется связанный с ферментом аденилилцитруллин. Аргининосукцинат расщепляется *аргининосукциназой* с образованием аргинина и фумаровой кислоты:



Эта реакция не является ни гидролитической, ни окислительной; она легко обратима. Фермент широко распространен в природе; он имеется в почках, печени и мозге и был получен в кристаллическом виде из бычьей печени.

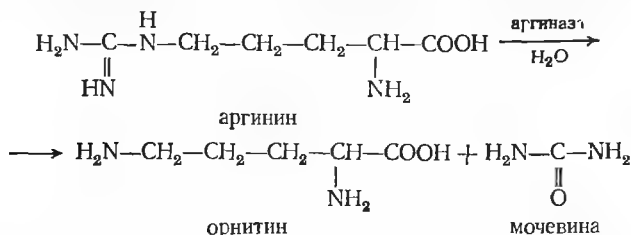
Группа реакций, приводящих к включению NH_3 в состав цитруллина, осуществляется в митохондриях, а последующие стадии синтеза аргинина происходят в цитозоле.

Поскольку орнитин получает свою δ -аминогруппу в результате переаминирования от глутамата (разд. 21.4.2.5), а аспартат также получает аминогруппу от глутамата, очевидно, что два из трех атомов азота гуанидиновой группы аргинина имеют своим источником глутаминовую кислоту. Третий атом азота поставляется карбамоилфосфатом; однако этот азот может также в конечном счете поставляться глутаматом либо в результате действия глутаматдегидрогеназы, либо через глутамин (разд. 21.4.2.1). Образующаяся в аргининосукцинатной реакции фумаровая кислота может быть гидратирована в малат (последний, как известно, окисляется до оксалоацетата в цикле лимонной кислоты). Далее оксалоацетат в результате переаминирования переходит в аспартат, а последний вновь вступает в цепь реакций синтеза аргинина.

21.4.4. Синтез мочевины

Гидролиз аргинина является источником мочевины — нейтрального, нетоксичного соединения, которое переносится через кровь в почки и экскретируется с мочой как главный конечный продукт азотистого метаболизма у млекопитающих. Хотя аргинин имеется во всех клетках животного организма, образование мочевины происходит почти исключительно в печени — единственном органе, который содержит *аргиназу*. Очень незначительный синтез мочеви-

ны может происходить также в почках и в мозге, но вклад этих органов в общий баланс, по-видимому, весьма незначителен:



Аргиназа (M 120 000) состоит из четырех субъединиц, с каждой из которых связан один атом Mn^{2+} . Орнитин — второй продукт приведенной выше реакции — может функционировать в циклическом режиме. При взаимодействии с карбамоилфосфатом он образует цитруллин (первая реакция в последовательности, ведущей к образованию мочевины).

Рассмотренный выше процесс образования мочевины можно представить схематически в виде последовательности $\text{NH}_3 \rightarrow \text{карбамоилфосфат} \rightarrow \text{цитруллин} \rightarrow \text{аргинин} \rightarrow \text{мочевина}$. Энергия для синтеза мочевины поступает за счет двух молекул АТФ, обеспечивающих синтез карбамоилфосфата, и одной молекулы АТФ, используемой при синтезе аргининоянтарной кислоты. Поскольку в последнем случае отщепляется пиррофосфат ($\text{ATP} \rightarrow \text{AMP} + \text{PP}_i$), который затем гидролизует пиррофосфатазой ($\text{PP}_i + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{P}_i$), всего для синтеза мочевины необходимо четыре богатых энергией фосфатных эквивалента.

Азотистые соединения мочи у взрослого человека, находящегося в состоянии азотистого равновесия, можно разделить на три класса: 1) большое число различных соединений, секретируемых ежедневно в небольшом, но относительно постоянном количестве, например креатинин, мочевая кислота и N' -метилникотинамид; 2) NH_3 , экскреция которого является функцией кислотно-основного баланса; образование его в почках и экскреция обеспечивают удаление избыточных протонов (гл. 35); 3) мочевина, количество которой определяется разностью между количеством азота, полученного с пищей, и количеством азота в других приведенных выше экскретируемых соединениях. При положительном азотистом балансе экскреция мочевины уменьшается; если происходит увеличение экскреции азота вследствие повышения распада белков организма, повышение азота мочи происходит за счет мочевины. Таким образом, образование и экскреция мочевины являются тем регулирующим механизмом, с помощью которого поддерживается азотистое равновесие.

Редкие наследственные заболевания *аргининосукцинурия* и *цитруллинурия* характеризуются высоким уровнем в крови и экс-

крецией с мочой аргининосукцината и цитруллина соответственно. Оба заболевания ведут к задержке умственного развития. Несмотря на то что оба экскретируемых вещества являются промежуточными соединениями орнитинового цикла (разд. 21.4.3.5), выделение мочевины остается практически нормальным. В связи с этим предполагают, что эти врожденные заболевания обусловлены недостатком специфических изоферментов мозга, которые в норме участвуют в синтезе мочевины, а именно фермента, катализирующего конденсацию цитруллина с аспарагиновой кислотой, приводящую к образованию аргининоянтарной кислоты, и фермента, расщепляющего последнюю.

21.5. Общие аспекты метаболизма аминокислот

Метаболизм аминокислот у бактерий, находящихся в логарифмической фазе роста на богатой питательной среде, и у млекопитающих значительно различается. Бактерии акцептируют из среды в требуемом количестве аминокислоты, необходимые для максимального синтеза белка. У бактерий происходит лишь незначительная деградация белка, и потребление аминокислот из среды соответствует сумме аминокислот, включенных в белок и использованных для синтеза различных азотистых соединений, присущих этим организмам. В окружающую среду возвращается либо немного азота, либо он вообще не возвращается (за исключением азота, входящего в состав гидролитических ферментов, иногда выделяемых клеткой в среду).

В организме млекопитающих ситуация другая. На всех стадиях существования человеческого организма происходит постоянный приток и уход азотистых соединений. Аминокислоты и (в меньшем количестве) другие азотистые соединения поступают в организм и подвергаются превращениям, продукты их метаболизма экскретируются с мочой и фекалиями. В период младенчества и детства, а также при выздоровлении после тяжелых заболеваний поступление азота превышает выделение (*положительный азотистый баланс*); противоположная ситуация может превалировать в старости в период голодания (относительно недолго) или же в течение некоторых истощающих заболеваний (*отрицательный азотистый баланс*). Однако даже в период младенчества или старости ежедневное отклонение от азотистого равновесия обычно невелико; количество задерживаемого или избыточно выводимого азота составляет лишь небольшую долю всего метаболизируемого азота.

Аминокислоты, поступающие с пищей или из эндогенных источников, используются далее по одному или нескольким следующим путям: 1) включение в белки; 2) включение в состав неболь-

ших пептидов; 3) обеспечение азотом синтеза «заменимых» аминокислот; 4) использование для синтеза азотистых соединений, не являющихся аминокислотами; 5) удаление аминогруппы (с последующим образованием мочевины) и окисление образующейся α -кетокислоты.

Последний процесс характеризует «решение» организмом млекопитающего задачи, обусловленной вариабельностью поступающих белков (а следовательно, и набора аминокислот). Птицы и акулы экскретируют другие продукты (мочевую кислоту и NH_3 соответственно), при этом, однако, решается та же задача — устранение избытка азота, полученного организмом.

Для животных характерна определенная потребность в отношении ежедневного потребления общего количества азота и каждой из незаменимых аминокислот. Если животные получают диету, содержащую достаточные количества незаменимых аминокислот и витаминов и обеспечивающую организм необходимым количеством калорий, то у молодых животных наблюдается максимальный рост, а взрослые животные находятся в состоянии азотистого равновесия. Удаление из диеты какой-либо одной из незаменимых аминокислот (или же всех их) быстро приводит к отрицательному азотистому балансу, выражающемуся в ежедневной потере 4—5 г азота. Эта ответная реакция связана, по-видимому, с функционированием тех ферментных систем, которые постоянно катализируют синтез ряда азотистых соединений, таких, как пурины, пиримидины, никотиновая кислота, креатин и др. Активности всех этих ферментных систем, по-видимому, регулируются (причем каждая из них имеет свою ключевую стадию); они получают азот из общего аминокислотного пула независимо от того, какие аминокислоты поступают с пищей. Если одна из незаменимых аминокислот исключается из диеты (в экспериментальных условиях), она, однако, сохраняется в пуле аминокислот, поскольку определенное количество белка (сывороточный альбумин, пищеварительные ферменты, гормоны) постоянно подвергается гидролизу, а определенные освобождающиеся аминокислоты используются соответствующими ферментами для синтеза необходимых метаболитов (например, для синтеза никотиновой кислоты необходим триптофан, разд. 23.2.15). Характер превращений остальных аминокислот при этом не изменяется. Отрицательный азотистый баланс, обусловленный отсутствием в диете одной из незаменимых аминокислот, будет характеризоваться примерно такими же параметрами, как и при отсутствии всех незаменимых аминокислот.

Максимальный отрицательный азотистый баланс наблюдается при голодании. Это обусловлено главным образом не необходимостью в синтезе азотистых соединений, а тем обстоятельством, что освобождающиеся при гидролизе белков определенные аминокислоты используются для обеспечения энергетических потребностей

организма. Это те аминокислоты, при окислении углеродных цепей которых может происходить образование АТР, т. е. аминокислоты, из которых могут образовываться промежуточные соединения цикла лимонной кислоты. Избыток образующегося азота удаляется затем путем синтеза мочевины. Максимальное количество экскретируемого в этих условиях азота составляет около 20 г в день.

21.5.1. Использование аминокислот для синтеза белка

Очевидно, что увеличение суммарного количества белков организма при росте организма и выздоровлении происходит за счет аминокислот пищи. Следует, однако, иметь в виду, что в этих условиях количество фактически синтезируемого белка значительно превосходит регистрируемый прирост. Даже у взрослого организма в состоянии азотистого равновесия происходят постоянный синтез пищеварительных ферментов (которые могут удаляться с кишечным содержимым), белковых гормонов, образующихся в эндокринных железах и подвергающихся распаду в различных тканях организма, образование и деградация белков плазмы и полная замена белков популяций клеток с относительно непродолжительным периодом существования, например эритроцитов, лейкоцитов и клеток слизистой желудочно-кишечного тракта.

Непрерывное включение азота в структурные белки тканей у взрослого животного в состоянии азотистого равновесия было убедительно показано с помощью изотопов. В результате исследований, в которых аминокислоты, меченные ^{15}N и (или) ^2H , вводили в рацион крыс, находящихся в состоянии азотистого равновесия, было установлено, что меченые аминокислоты всегда оказываются в смеси осаждаемых тканевых белков. Эти результаты привели к созданию концепции, согласно которой обмен белков рассматривался как динамический процесс, в ходе которого белки организма постоянно обновляются, т. е. они непрерывно синтезируются и подвергаются деградации. Поскольку количество белков остается постоянным, синтез и распад должны протекать с равными скоростями.

Образование новых клеток всегда связано с дополнительным синтезом белка. Действительно, даже у млекопитающих практически все белки каждой данной клетки образуются *in situ*. Скорость обновления белков различных структур организма сильно варьирует, при этом она лишь частично зависит от масштаба образования новых клеток. Белковый синтез является постоянной характеристикой зрелых неделящихся клеток. Даже конститутивные ферменты (например, альдолаза) нормальных неделящихся клеток печени взрослого животного содержат введенные в организм меченные изотопами аминокислоты; эти белки характеризуются периодами полураспада порядка нескольких недель. Менее

лабильными являются структурные белки, такие, как миозин мышц (гл. 36), период полураспада которых составляет более 6 месяцев. Это, однако, не отражает различий между печенью и мышцами в отношении всех конститутивных белков этих органов. Через 30 мин после инъекции кролику восьми меченых аминокислот удельные активности этих аминокислот оказались одинаковыми в трех различных кристаллических ферментах, выделенных из скелетной мышцы. Это показывает, что: 1) мышечные клетки постоянно синтезируют новые белки; 2) синтетический процесс является быстрым; 3) в данной клетке все белки образуются из общего пула свободных аминокислот; 4) рассматриваемый процесс является синтезом *de novo* всей белковой молекулы; ресинтеза белков из продуктов их частичной деградации не происходит; 5) индивидуальные белки данного типа клеток могут значительно различаться по скоростям обновления.

Белки, которые обычно находятся вне клеток, также обновляются с различными скоростями (гл. 29). В общем растворимые белки, уходящие из клеток, заменяются новыми белками относительно быстрее, чем белки, которые остаются внутри клеток. Так, у человека, находящегося в состоянии азотистого равновесия, период полураспада сывороточных белков составляет примерно 10 дней. Однако главный внеклеточный белок соединительной ткани коллаген у взрослых животных почти не включает меченых аминокислот; при этом меченые аминокислоты, включившиеся в коллаген в период роста животного, не уходят в дальнейшем из этого белка.

Введение меченых аминокислот позволило определить общую скорость синтеза белка. У человека, собаки и крысы скорости синтеза белка, выраженные в граммах азота на килограмм веса в день, составляют 0,6—1,0, 0,6 и 2,0 соответственно. Так, у взрослого человека весом 70 кг за сутки синтезируется и расщепляется около 400 г белка. Для сопоставления следует иметь в виду, что житель США получает в среднем ежедневно с пищей около 100 г аминокислот и что общее количество свободных аминокислот в жидкостях организма составляет примерно 30 г. Особенно примечательно то, что высокая скорость синтеза белка точно уравновешивается скоростью его деградации. Факторы, регулирующие синтез белков, в самом общем виде рассмотрены в гл. 26. Очевидно, что не имеется единой системы регуляции, а осуществляется независимая регуляция синтеза каждого белка, так что синтезы определенных белков протекают со скоростями, обеспечивающими соответствующие физиологические потребности. Синтез каждого белка весьма точно сбалансирован с его распадом. Однако факторы, регулирующие скорости синтеза и деградации белков, выяснены не до конца. Очевидно, однако, что в общем случае поступление аминокислот не является лимитирующим скорость син-

теза процессом, поскольку масштаб синтеза не может быть ускорен при увеличении поступления аминокислот (если оно уже является адекватным). Влияние различных эндокринных факторов на синтез белка будет рассмотрено в пятой части книги. В то время как аппарат синтеза белка обеспечивается энергией и информацией, внутриклеточный распад белка протекает, по-видимому, в результате простого гидролиза, катализируемого протеолитическими ферментами, находящимися в лизосомах, и другими цитоплазматическими протеиназами.

Все клетки, по-видимому, содержат большой набор протеолитических ферментов; печень, почки и селезенка особенно богаты протеиназами. Следует, однако, иметь в виду, что внутриклеточные протеиназы этих тканей, часто называемые *катепсинами*, отличаются по характеру от образующихся (в форме зимогенов) в слизистой желудка и в панкреасе протеолитических ферментов, которые гидролизуют белки пищи в желудочно-кишечном тракте (разд. 21.1). С другой стороны, большинство пептидаз, обнаруженных в слизистой кишечника (разд. 21.2), широко распространены в тканях млекопитающих, например в почках, печени, мозге, мышцах и матке. Протеиназы и пептидазы всех клеток служат, следовательно, для деградации денатурированных внутриклеточных белков. Клетки печени и некоторых других тканей могут улавливать белки гемолизированных эритроцитов, денатурированные белки плазмы и др. и после гидролиза возвращать аминокислоты в общий пул организма. Далее, поскольку белковые и пептидные гормоны должны быть инаktivированы после завершения ими своей функции, эти соединения также в основном гидролизуются до аминокислот. Следовательно, внутриклеточные протеолитические ферменты могут выполнять также регуляторные функции, удаляя биологически активные молекулы.

21.5.2. Регуляция метаболизма аминокислот

Рассматриваемые в этом разделе процессы являются в значительной мере саморегулируемыми. Синтез белка рассматриваться не будет; его механизмы и регуляция описаны в гл. 26. Как отмечалось выше, синтез различных азотсодержащих соединений, не являющихся аминокислотами, но образующихся из них, должен протекать со скоростью, определяемой ключевой стадией на пути синтеза данного соединения, и, следовательно, не должен практически зависеть от уровня содержания исходной аминокислоты. Об этом свидетельствует относительно постоянное количество рассматриваемых азотсодержащих соединений в моче. Другой процесс удаляет азот из небелкового азотистого пула; это образование и экскреция почками NH_3 , которые наблюдаются в метаболических условиях, требующих экскреции кислой мочи. Аммиак образуется главным образом в результате гидролиза глутамина.

Очевидно, что поддержание азотистого равновесия связано с регуляцией синтеза мочевины; азотистое равновесие достигается в условиях, при которых количество мочевины в моче соответствует разности между суммарным количеством потребленного азота и количеством азота всех других (помимо мочевины) соединений в моче. Учитывая изложенные выше сведения, можно считать, что азотистое равновесие саморегулируется; действительно, накопление аминокислот способствует их переаминированию с α -кетоглутаровой кислотой. Образующийся глутамат окисляется с освобождением NH_3 , последний участвует в образовании карбамоилфосфата и аспартата и таким образом стимулирует образование аргинина — предшественника мочевины.

Рассмотренные выше соотношения являются, однако, не кинетическими, а термодинамическими. Другой уровень регуляции обеспечивает протекание рассматриваемых процессов со скоростями, соответствующими потребностям организма. Действительно, суммарная активность вовлекаемых ферментов зависит от нагрузки, создаваемой потребленным с пищей белком. При богатой белками диете активность многих (по-видимому, большинства) аминотрансфераз в печени значительно увеличивается. Их активность повышается также в ответ на вызываемое богатой белками диетой увеличение секреции кортикостероидов. Следовательно, эффект может быть опосредован через кору надпочечников; однако остается неясным, на какой именно стимул отвечает эндокринная железа. Такого же характера влияние оказывает диета на ферменты, участвующие в биосинтезе аргинина. При богатой белками диете концентрация всех пяти ферментов биосинтеза медленно повышается. Учитывая наличие двух изоферментов аспартат-глутамат-аминотрансферазы, можно предполагать, что митохондриальный фермент, локализованный в одном компартменте с ферментами первых двух реакций системы синтеза мочевины, находится под индивидуальным контролем. При малобелковой диете количество всех рассмотренных ферментов уменьшается. Примечательно, что в условиях, когда экспериментальная диета бедна всеми аминокислотами, за исключением аргинина, наблюдается увеличение количества только двух «финальных» ферментов синтеза мочевины — аргининосукциназы и аргиназы.

Суммируя, можно отметить полный контраст между животными и микроорганизмами в отношении регуляции метаболизма аминокислот. У микроорганизмов, когда они попадают в среду, богатую всеми аминокислотами, происходит репрессия синтеза тех ферментов, которые вовлекаются в синтез аминокислот. Когда же подобную богатую аминокислотами пищу получают животные, они отвечают повышением способности деградировать аминокислоты.

Глава 22

МЕТАБОЛИЗМ АМИНОКИСЛОТ. III

*Синтез амидов и олигопептидов. Переамидинирование.
Переметилирование. Синтез порфиринов.
Декарбоксилирование аминокислот.
Синтез полиаминов*

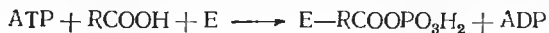
Основная судьба аминокислот — включение в белки (гл. 26). Аминокислоты необходимы также для синтеза соединений, выполняющих различные функции в метаболизме. Подобные примеры уже встречались при синтезе самих аминокислот; так, глутаминовая кислота является донором аминогрупп при переаминировании, глутамин является донором аммиака, метионин — источником метильных групп, а серин — источником активных $-\text{CH}_2\text{OH}$ - и $-\text{CHO}$ -групп. Использование определенных аминокислот в синтезе пуринов и пиримидинов рассмотрено в гл. 24. В данной главе приведены другие примеры, показывающие участие аминокислот в синтезе различных азотсодержащих соединений.

22.1. Синтез амидов и олигопептидов

Все живые клетки синтезируют различные амиды аминокислот и олигопептиды. Во всех случаях необходимая энергия поступает за счет АТФ, это осуществляется, однако, несколькими путями.

22.1.1. Амиды

Синтез *глутамина* можно рассматривать как прототип синтеза амидов; сначала образуется связанный с ферментом ацилфосфат



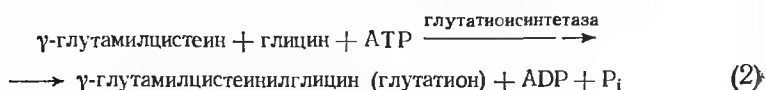
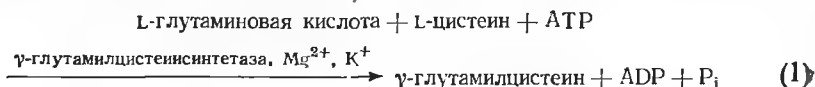
который реагирует с аммиаком, образуя амид.

22.1.2. Олигопептиды

Механизм, подобный рассмотренному выше, используется при синтезе *глутатиона* (γ -глутамилцистеинилглицина). Этот трипептид имеется во всех изученных клетках, и на его долю приходится до

90% небелковых тиоловых групп (до 10 мМ), имеющих в клетках млекопитающих. Предполагаемая роль глутатиона в транспорте аминокислот была рассмотрена выше (разд. 2.1.2); он может также участвовать в качестве восстановителя при синтезе дезоксирибонуклеопротеидов в бесклеточных препаратах из *E. coli* (разд. 2.4.1.7).

В глутатионе имеется одна γ -пептидная связь (а не обычная α -пептидная связь). Синтез трипептида осуществляется в две стадии.

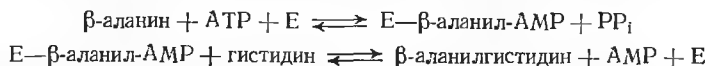


В ходе реакции (2) в качестве промежуточного соединения образуется связанный с ферментом глутаминилцистеинилацилфосфат; затем ацилфосфатная группа замещается глицином, и происходит освобождение трипептида и фермента.

Ни один из двух ферментов [реакции (1) и (2)] не является специфичным; первый может катализировать образование γ -глутамилаланина или γ -глутамил- α -аминомасляной кислоты, а второй может катализировать образование различных офтальмовых кислот (гл. 40).

22.1.2.1. Синтез карнозина

Дипептид β -аланилгистидин, карнозин, первоначально обнаруженный в мышце, образуется в результате реакции, катализируемой карнозинсинтетазой; в процессе реакции карбоксильная группа активируется, образуя ангидрид с АМР; этот процесс в известной мере аналогичен образованию производных типа ацил-СоА (разд. 17.5)

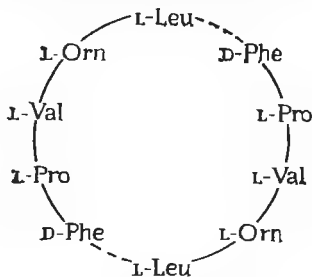


Карнозинсинтетаза катализирует также синтез ансерина (β -аланил-N'-метилгистидина); при этом N'-метилгистидин заменяет гистидин в приведенной выше реакции. Фермент является относительно неспецифичным; он способен катализировать образование ряда дипептидов; при этом либо гистидин может быть заменен другой аминокислотой, либо β -аланин заменен другими β - или ω -аминокислотами. Например, в мозге фермент, используя имеющуюся там в большом количестве γ -аминомасляную кислоту, катализирует образование γ -аминобутирилгистидина (*гомокарнозина*) со скоростью в 10 раз большей, чем синтез карнозина (гл. 37).

В физиологических условиях свободная энергия гидролиза $АТФ \rightarrow АДР + P_i$ достаточна для осуществления синтеза глутамина и глутатиона, в случае же синтеза карнозина освобождается PP_i и дальнейший гидролиз последнего делает синтез карнозина совершенно необратимым. Еще более существенным моментом (при сопоставлении с синтезом глутамина) является образование в качестве промежуточного продукта ациладенилата, т. е. использование того же механизма активации аминокислот, который функционирует при синтезе крупных полипептидов и белков (гл. 20).

22.1.2.2. Синтез более крупных олигопептидов

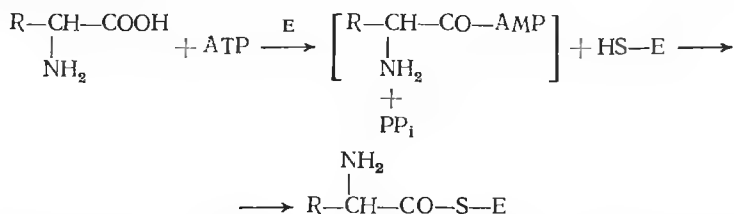
Рассматриваемые олигопептиды могут иметь $M \sim 2500$, т. е. содержат до 20—25 остатков аминокислот. Принципиальным обстоятельством является то, что у каждого из полипептидов аминокислоты расположены в определенной упорядоченной последовательности. Следовательно, система синтеза должна содержать информацию, обеспечивающую упорядоченность присоединения соответствующих аминокислот в процессе роста цепи. В качестве модели процесса такого типа ниже приведен синтез антибиотика *граммицидина S* из *Bacillus brevis*. В настоящее время еще не ясно, являются ли подобные реакции основой синтеза других низкомолекулярных полипептидов, например регулярных факторов гипоталамуса (гл. 41), или же данная модель характерна только для синтеза у бактерий.



граммицин S

Для осуществления синтеза *граммицидина* (прерывистые линии указывают места циклизации в процессе синтеза) необходимы только два растворимых фермента, входящие в состав комплекса, называемого *граммицин-синтетазой*. Свойства фермента I ($M 280\,000$) сходны со свойствами соответствующего фермента, участвующего в синтезе жирных кислот (гл. 17). Фермент способен катализировать образование на своей поверхности соответствующего аминоксил-АМР с каждой из входящих в состав пептида аминокислот. Аминоксил-АМР, не покидая поверхности, сразу же

взаимодействует с сульфгидрильной группой ковалентно связанного с белком 4'-фосфопантетеина, подобно тому как это имеет место в случае белка АСР, участвующего в синтезе (удлинении цепи) жирных кислот (разд. 17.6.1.2). Процесс может быть представлен следующей схемой:

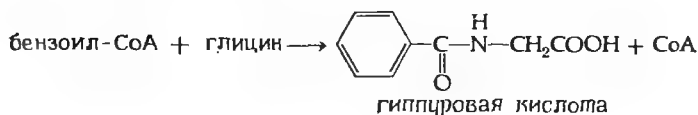
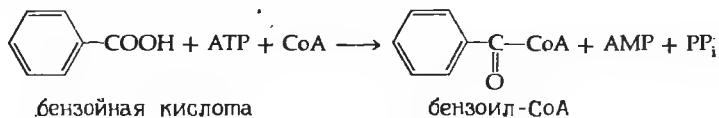


Фермент II (M 100 000) начинает процесс; он осуществляет два превращения: активацию L-фенилаланина, т. е. образование аминокацил-АМР, и инверсию α -углеродного атома с образованием (связанного) D-стереоизомера. Аминокислота, образовавшая ацилтиоэфирную связь на ферменте I, входящем в состав комплекса, переносится затем на экспонированную аминогруппу фенилаланина, находящегося на ферменте II, с образованием дипептида. В результате повторения этого процесса образуется пептидил-S-фермент II. Конечный продукт — циклический декапептид — образуется путем взаимодействия «голова — хвост» остатков фенилаланина двух таких цепей с N-концевыми остатками лейцина. Фермент I может активировать любой из своих четырех аминокислотных субстратов, однако, когда все четыре субстрата присутствуют одновременно вместе с фенилаланином, связанным с ферментом II, то при образовании пентапептида осуществляется уникальный специфический порядок присоединения аминокислот. Фенилаланил-S-фермент и растущий последовательно пептид, по-видимому, так изменяют на каждой стадии конфигурацию фермента II и тем самым его специфичность, что обеспечивается требуемая последовательность активации и переноса аминокислот. Изменение специфичности фермента, обусловленное тесным взаимодействием с другим белком, уже отмечалось раньше (разд. 8.7.2.3), однако описанный выше процесс является, по-видимому, еще более поразительным.

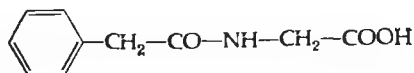
22.1.3. N-Ациламинокислоты

N-Ацилпроизводные аминокислот, а также меркаптуровые кислоты (см. ниже) экскретируются почками в виде соединений, сопряженных с глюкуроновой кислотой, с которой они образуют сложноэфирную связь. Это обеспечивает возможность выведения нерастворимых в исходной форме соединений в виде растворимой натриевой соли. Выделенная первоначально из мочи лошади гиппуровая кислота (N-бензоилглицин) в небольшом количестве имеется

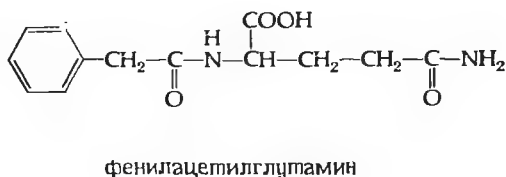
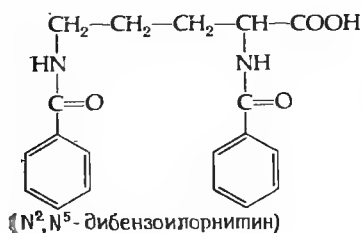
также в моче человека. Синтез ее происходит в печени и может быть значительно увеличен путем введения бензойной кислоты. Образование гиппуровой кислоты и других сходных соединений напоминает синтез эфиров в том отношении, что происходит активация карбоновой кислоты в форме соответствующего ацил-СоА, который является непосредственным ацилирующим агентом в реакции, катализируемой *ацил-СоА-трансферазой*. Образование бензоил-СоА проходит через стадию промежуточного соединения, связанного с ферментом ациладенилата.



Образующаяся в ходе метаболизма или введенная в организм фенилуксусная кислота превращается подобным же путем в фенацетуровую кислоту.



У некоторых птиц активирование бензойной и фенилуксусной кислот осуществляется таким же образом, затем, однако, происходит взаимодействие с α - и δ -аминогруппами орнитина с образованием N^2, N^5 -дibenzoил- или N^2, N^5 -дифенилацетилорнитина. У человека бензойная кислота конъюгируется с глицином, однако фенилацетил-СоА реагирует не только с глицином, образуя фенилацетуровую кислоту (см. выше), но также и с α -аминогруппой глутамина, образуя фенилацетилглутамин.



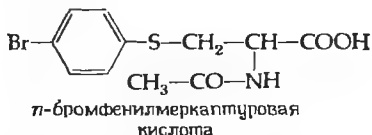
Многие другие низкомолекулярные ароматические кислоты, вводимые животным, образуют подобные соединения.

В митохондриях печени имеются два фермента, *ацил-СоА : глицинтрансфераза* и *ацил-СоА : L-глутамин-N-ацилтрансфераза*, каждый из которых специфичен к одной из двух аминокислот, используемых в процессе конъюгации ароматических кислот. Специфичность обоих частично очищенных ферментов из печени обезьян (*rhesus*) и человека к субстратам и ингибиторам согласуется с полученными *in vivo* данными о специфической конъюгации с глицином или глутамином.

Введение избыточных количеств некоторых аминокислот приводит к выделению соответствующих N-ацилпроизводных, образующихся, вероятно, в результате реакции с ацетил-СоА. Физиологическая роль ферментов, катализирующих эти различные синтезы, неизвестна.

22.1.4. Меркаптуровые кислоты

Введение животным галогенсодержащих алифатических или ароматических углеводородов, например бромбензола, приводит к экскреции с мочой меркаптуровых кислот. В случае бромбензола выделяется



Образование меркаптуровой кислоты начинается с реакции между глутатионом и галогенированным углеводородом, катализируемой группой ферментов (называемых *глутатион-S-трансферазами*), приводящей к образованию соответствующего смешанного тиоэфира. Остатки глутаминовой кислоты и глицина удаляются путем гидролиза, а S-бромфенилцистеин ацетируется за счет ацетил-СоА.

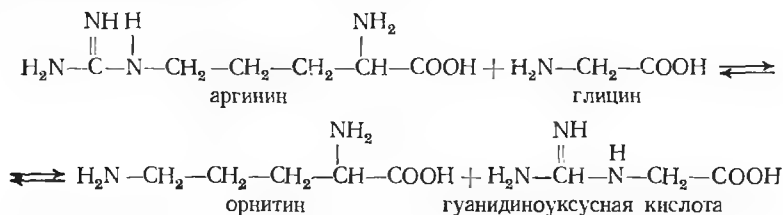
Печень млекопитающих содержит четыре различные глутатион-S-трансферазы, характеризующиеся различными величинами K_m для сходных субстратов. Каждый фермент (M 50 000) состоит из двух одинаковых субъединиц. Эти трансферазы выполняют две важные функции. Первая функция — они делают водорастворимыми и менее токсичными ряд чужеродных для живой клетки соединений, выделяемых затем почками. К числу таких соединений относятся галогенированные алифатические и ароматические углеводороды, а также метаболиты различных углеводородов; некоторые из них, как известно, являются канцерогенными. Вторая функция —

связывание и регуляция притока из плазмы в печень большого числа органических анионов; в число последних входят метаболиты, образующиеся в норме в печени, например желчный пигмент билирубин (гл. 32), гем, некоторые стероиды, а также соединения, вводимые с целью изучения функции печени, например бромсультфаленн (гл. 34).

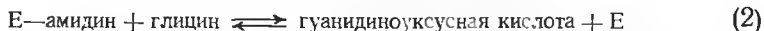
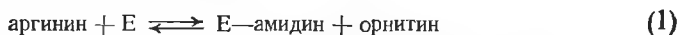
Трансфераза, называемая глутатион-S-трансферазой В, идентична белку печени, называемому *лигандином*, который интенсивно изучали в связи с его ролью в транспорте органических анионов в печень.

22.2. Переамидинирование

Ежедневно человек выделяет с мочой такое количество креатинина (гл. 35), ангидрида креатина, которое значительно превышает сумму потребленного креатина и креатинина. Синтез креатина начинается с обратимого переноса гуанидинового фрагмента аргинина на глицин; этот процесс называется *переамидинированием* и катализируется трансамидиназой, которая была получена в очищенном виде из почек свиньи.



Процесс протекает в две стадии:



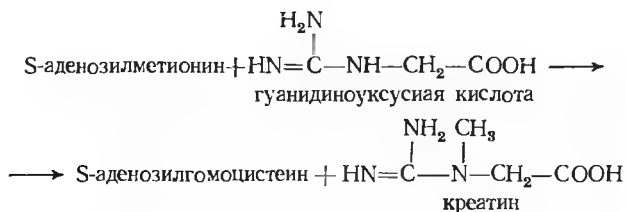
Стабильный амидин-ферментный комплекс был выделен после инкубации аргинина, меченного ^{14}C по гуанидиновой группе, с трансамидиназой. Природа связи амидиновой группы с ферментом неизвестна; при нагревании комплекса происходит образование мочевины. При добавлении к выделенному комплексу глицина происходит реакция (2). Трансамидиназная активность обнаружена в печени человека, но не обнаружена в печени крысы, кролика и собаки.

Образующаяся, как описано выше, гуанидиноуксусная кислота затем метилируется, в результате образуется креатин (см. ниже). Эта система является одной из немногих известных у млекопитающих, которая репрессируется по типу отрицательной обратной свя-

зи. Скармливание креатина крысам значительно снижает уровень активности трансамидиназы в почках; инъекция креатина в ткани развивающегося куриного эмбриона также тормозит образование фермента. Поскольку метаболическая репрессорная активность эндогенно синтезированного креатина такая же, как экзогенного, рассматриваемый феномен следует считать физиологическим. Важность этого контролирующего механизма выявляется, если «обойти» регулируемую стадию и инъектировать животному гуанидиноксусную кислоту. В этом случае наблюдается интенсивный синтез креатина, который приводит к жировому перерождению печени (разд. 17.10.2.4) и нарушению роста; оба эти явления могут быть предотвращены путем введения метионина.

22.3. Переметилирование

Перенос метильных групп катализируется *метилферазами* или *метилтрансферазами*. В большинстве случаев метилирующим агентом является S-аденозилметионин, образующийся из метионина и АТР (разд. 21.4.2.10). Синтез креатина завершает *гуанидинацетат-метилтрансфераза*.



Как показано в табл. 22.1, метильная группа может быть перенесена на серу, азот, углерод или кислород. S-Аденозилметионин служит универсальным донором метильных групп для многочисленных акцепторов, донором же метильной группы для метионина служит лишь ограниченное число источников. Главным источником метильной группы является N⁵, 10-метилентетрагидрофолиевая кислота (разд. 21.4.2.8), которая в свою очередь получает ее от ограниченного числа метаболитов, в первую очередь от серина (разд. 21.4.2.8), поставляющего одноуглеродную функциональную группу.

В селезенке телят имеется фермент, который катализирует перенос метильной группы от S-аденозилметионина на ряд различных белков. Этот фермент, названный *протеинметилазой II*, метилирует свободные аминогруппы белков, однако он не использует в качестве субстратов аминокислоты или небольшие пептиды. Метаболическая роль этого фермента в настоящее время неясна;

Таблица 22.1

Некоторые примеры переметилирования

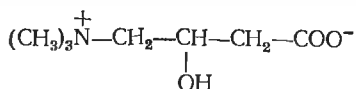
Субстрат	Продукт	Метилирующий агент
Гомоцистеин	Метионин	N ⁵ -Метилтетрагидро- фолиевая кислота Метил-B ₁₂ Бетани (из холина)
N-Ацетил-5-окситрипт- амин	Мелатонин	S-Аденозилметионин
Карнозин	Ансерин	То же
β-Ситостерин ^a	Эргостерин	»
^b	Витамин B ₁₂	»
Адреналин	Метадреналин	»
Гуанидиноуксусная кис- лота	Креатин	»
Гистамин	N-Метилгистамин	»
Никотиновая кислота	Тригонеллин	»
Никотиамид	N ¹ -Метилиникотинамид	»
Норадреналин	Адреналин	»
Фосфатидилэтаноламин	Фосфатидилхолин	»

^a Только в растениях.^b Метилируемый субстрат не идентифицирован; экспериментальные данные получены для микроорганизмов, которые росли на среде, содержащей меченый метилирующий агент; продукт метилирования (витамина B₁₂) был подвергнут анализу для локализации меченой метильной группы.

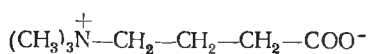
возможно, он имеет значение в образовании остатков моно-, ди- и триметиллизина, имеющих у ряда белков, например гистонов (разд. 7.2.12.1).

22.3.1. Образование карнитина

Опыты, проведенные с мечеными изотопами соединениями, показали, что как у крыс, так и у *Neurospora* атомы углерода 3, 4, 5 и 6, а также ε-аминогруппа лизина поступают в карнитин в составе одного фрагмента. γ-Бутиробетанин также превращается в карнитин.

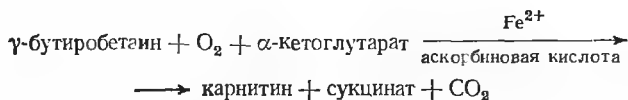


карнитин



γ-бутиробетанин

γ -Аминомасляная кислота не является предшественником ни γ -бутиробетаина, ни карнитина. При биосинтезе карнитина происходит последовательное метилирование за счет S-аденозилметионина либо свободного, либо находящегося в составе белка лизина с образованием ϵ -N-триметиллизина, который в результате ряда реакций утрачивает атомы углерода 1 и 2, образуя γ -бутиробетанин. Последний затем гидроксилируется с образованием карнитина в ходе реакции, катализируемой γ -бутиробетанин-гидроксилазой, находящейся в цитозоле печени. Фермент является диоксигеназой, функционирующей при участии O_2 , кетоглутарата, Fe^{2+} и аскорбиновой кислоты (разд. 13.6.4.2).



Карнитин участвует в транспорте ацильных групп жирных кислот в митохондрии (и из митохондрий) (разд. 15.5). При выраженном недостатке лизина не может синтезироваться адекватного количества карнитина, в результате происходит уменьшение использования жирных кислот как источников энергии (гл. 17).

22.3.2. Судьба метильных групп

Переметилирование, при котором донором является сульфонное соединение S-аденозилметионин, характеризуется благоприятным изменением свободной энергии в реакциях с большинством акцепторов. Другие доноры метильных групп в метаболических процессах также являются соединениями с достаточным запасом энергии. Так, ферментативное метилирование гомоцистеина бетаином, в ходе которого происходит перенос метильной группы от четвертичного азота, не требует дополнительного источника энергии.

В то же время диметилглицин и саркозин не могут выступать в качестве метилирующих агентов; их метильные группы удаляются в результате окислительного процесса, сопровождающегося переносом одноуглеродного фрагмента на тетрагидрофолиевую кислоту (разд. 21.2).

Как отмечалось выше, холин может быть окислен в бетаин (разд. 21.4.2.10), а затем одна из метильных групп может быть перенесена на гомоцистеин (если он оказывается доступным). В другом случае бетаин может утратить последовательно все свои метильные группы в результате окисления. Каждая из них окисляется до уровня $HCNO$, переносится на тетрагидрофолиевую кислоту и, таким образом, возвращается в пул C_1 -единиц; последовательно образуются следующие соединения: холин $\rightarrow$ бетаинальдегид $\rightarrow$ бетаин $\rightarrow$ диметилглицин $\rightarrow$ монометилглицин (саркозин) $\rightarrow$ глицин.

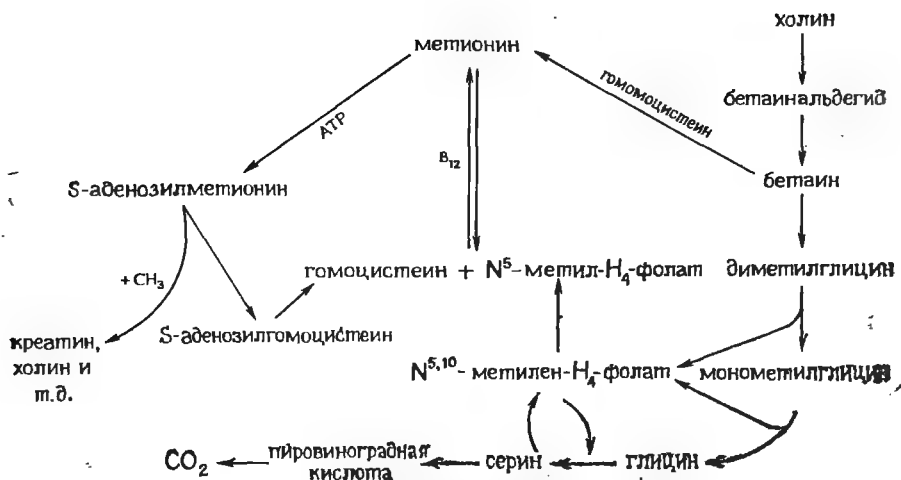


Рис. 22.1. Некоторые аспекты метаболизма метильных групп. N_4 -фолат — тетрагидрофолиевая кислота.

Конечная судьба C_1 -единиц у животных не вполне ясна. При введении животному метионина или саркозина, меченных ^{14}C по метильным группам, изотоп попадает в ожидаемые положения рассмотренных выше соединений. Однако значительная доля введенного изотопа появляется также в виде $^{14}CO_2$ — это окончательный вид меченого углерода: лишь небольшое количество его выделяется с мочой в составе креатинина, N^1 -метилникотинамида и т. д. В метаболизме животного не обнаружена реакция, в результате которой происходит прямое превращение углерода C_1 -производного тетрагидрофолиевой кислоты в двуокись углерода, однако у других организмов это главный путь метаболизма C_1 -единиц. Наиболее вероятный путь окисления C_1 -единиц в CO_2 — рекомбинация $N^{5,10}$ -метилентетрагидрофолиевой кислоты с глицином, приводящая к образованию серина (разд. 21.4.2.6), который далее при действии *сериндегидратазы* (разд. 23.2.5) превращается в пировиноградную кислоту. При окислении пировиноградной кислоты в цикле лимонной кислоты из углерода, ранее входившего в состав C_1 -пула, образуется CO_2 . Некоторые рассмотренные процессы приведены на рис. 22.1, а также на рис. 21.2.

22.4. Синтез порфиринов

Структурные особенности порфиринов и функции некоторых специфических классов порфиринов в процессах биологического окисления рассмотрены в гл. 12.

Сведения о реакциях биосинтеза порфиринов были первоначально получены в исследованиях, в которых следили за синтезом меченого изотопами протопорфирина гемоглобина либо после введения экспериментальным животным (а также людям) меченого глицина, либо в опытах *in vitro* путем инкубации содержащих ядра эритроцитов (жур или уток) или их гемолизатов с меченым изотопом глицином.

22.4.1. Синтез протопорфирина

Первая стадия в последовательности реакций, ведущих к синтезу протопорфирина, непосредственного предшественника гема, катализируется δ -аминолевулинат-синтазой. Очищенный фермент ($M \ 3 \div 5 \cdot 10^5$) из печени крысы абсолютно специфичен к субстратам — глицину и сукцинил-СоА; кофакторами его являются пиридоксаль-5'-фосфат и Mg^{2+} (рис. 22.2). Глицин реагирует со связанным с ферментом кофактором, образуя шиффово основание; в результате стабилизации анионом α -углеродный атом глицина становится более сильным нуклеофилом. Далее следует нуклеофильная атака на сукцинил-СоА и образуется связанная с ферментом α -амино- β -кетоадипиновая кислота; при декарбоксилировании последней образуется δ -аминолевулиновая кислота.

Как δ -аминолевулинат-синтаза, так и δ -аминолевулинат-дегидратаза (см. ниже) являются регулируемыми ферментами; они ингибируются гемом, гемоглобином и другими гемопротеидами. δ -Аминолевулинат-синтаза, катализирующая первую реакцию рассматриваемого пути, является ферментом, определяющим скорость всего процесса; она сама претерпевает быструю деградацию, период ее полураспада (в печени млекопитающих) около 1 ч. После введения аллилизопропилацетамида количество этого фермента в печени может увеличиться почти в 50 раз; это приводит к экспериментальной порфирии, которая напоминает заболевание человека — острую перемежающуюся порфирию (гл. 32). У таких больных активность фермента повышена; заболевание наследуется по аутосомному рецессивному типу.

Имеются данные о том, что некоторые лекарственные препараты и гормоны, особенно метаболиты стероидных гормонов с избирательно насыщенным кольцом А (гл. 45), также индуцируют синтез печеночной δ -аминолевулинат-синтазы.

Репрессорное действие гема на синтез фермента проявляется, по-видимому, либо на посттранскрипционной стадии, либо на стадии транскрипции.

У растений δ -аминолевулиновая кислота образуется не из глицина и сукцинил-СоА, а из глутаминовой кислоты; при этом используется целиком ее 5-углеродный скелет. Имеются данные, что промежуточным продуктом является α -кетоглутарат, образующийся из глутамата в результате переаминирования. Гипотетиче-

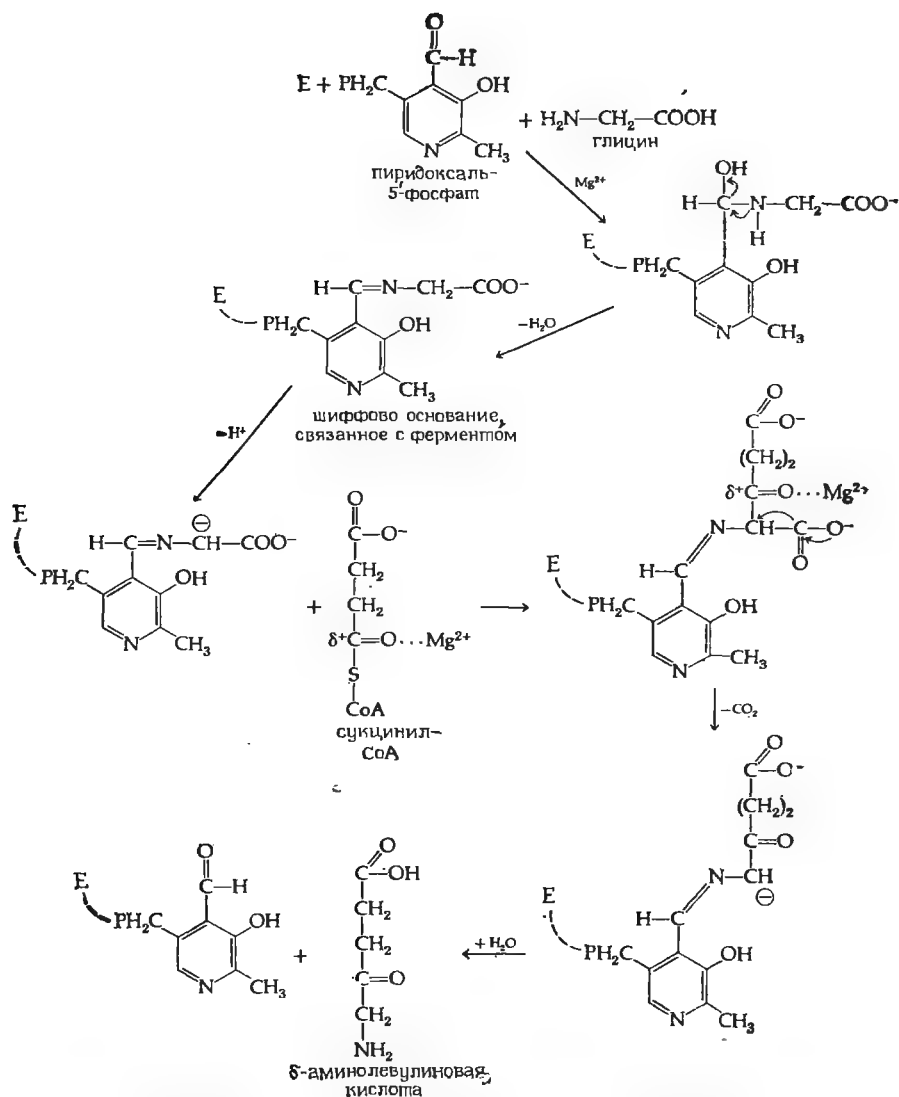


Рис. 22.2. Предполагаемый механизм действия δ -аминолевулинат-синтазы. В качестве катиона указан Mg^{2+} ; однако вместо него могут функционировать также Mn^{2+} и Co^{2+} (эти катионы менее активны). Благодаря участию в реакции катионов нуклеофильная атака полуацетата становится более эффективной, что ускоряет образование шиффова основания с глицином; катионы могут также активировать последующую конденсацию либо путем увеличения положительного характера карбонильной группы тиоэфира сукцинил-CoA, либо путем экранирования отрицательного заряда атакующего нуклеофила. Образование δ -аминолевулиновой кислоты завершается на стадии ее освобождения из связи с ферментом. Р — этирифицированный ортофосфат.

ский интермедиат между α -кетоглутаратом и δ -аминолевулином, — а именно γ,δ -диоксивалерат, из которого при переаминировании мог бы образоваться рассматриваемый продукт, до настоящего времени не идентифицирован.

В реакции, катализируемой δ -аминолевулинат-дегидратазой, при конденсации двух молекул δ -аминолевулината образуется порфобилиноген. Фермент из печени быка был получен в кристаллическом виде; его M 290 000, он состоит из восьми идентичных полипептидных субъединиц; он тормозится по принципу обратной связи гемом и упомянутыми выше гемсодержащими соединениями.

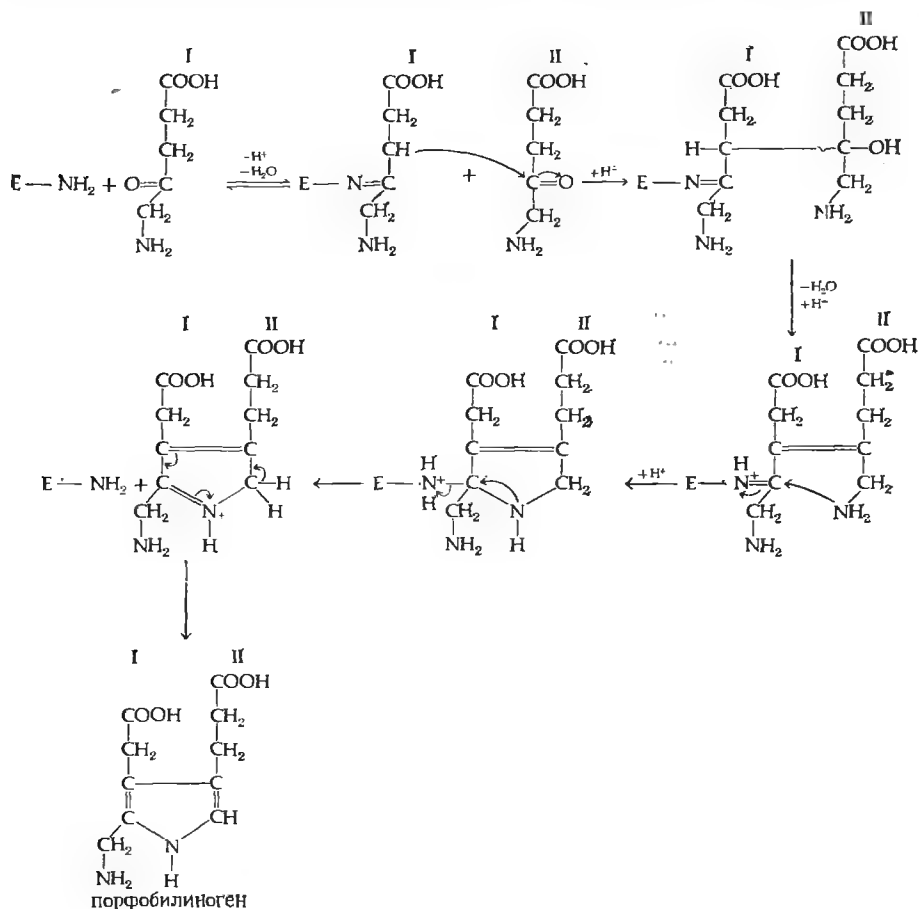


Рис. 22.3. Механизм конденсации двух молекул δ -аминолевулиновой кислоты, приводящей к образованию порфобилиногена; $E-NH_2$ обозначает дегидратазу δ -аминолевулината и ее функциональную аминогруппу; I и II обозначают молекулы δ -аминолевулиновой кислоты, участвующие в реакции конденсации (см. текст).

Механизм катализируемого дегидратазой образования порфобилиногена приведен на рис. 22.3. Одна молекула δ -левулината образует шиффово основание с ферментом; затем следует нуклеофильная атака образовавшимся промежуточным анионом карбонильного углерода второй молекулы δ -аминолевулината. При альдольной конденсации выделяется молекула воды, и свободная аминогруппа второй молекулы субстрата вытесняет аминогруппу фермента путем *транс-реакции Шиффа*; в результате образуется порфобилиноген.

22.4.1.1. Превращение порфобилиногена в протопорфирин

Путь превращения порфобилиногена в протопорфирин и процесс синтеза гема приведены на рис. 22.4. Поскольку в синтезе порфирина используются четыре молекулы порфобилиногена, все азоты порфирина имеют своим источником глицин. Исследования с применением изотопов показали, что в синтезе каждого порфиринового ядра используется восемь метиленовых углеродных атомов глицина. Из числа этих восьми атомов углерода четыре занимают положение 2 в каждом из пиррольных колец, т. е. они находятся в кольце рядом с атомом азота, другие четыре атома оказываются в метеновых мостиках между кольцами. Остальные 26 углеродных атомов порфиринового ядра поступают из сукцинил-СоА.

Ферментные препараты, использующие порфобилиноген для синтеза порфирина, были выделены из растений, микроорганизмов и тканей животных. Синтез гема и хлорофилла осуществляется по общему пути, ведущему к образованию протопорфирина IX (рис. 22.4). Внедрение в последний железа, приводящее к образованию гема, катализируется *феррохелатазой*. У растений наряду с синтезом гема в протопорфирин IX внедряется магний, образуя магнийпротопорфирин, который в пластидах превращается в хлорофилл.

Синтез протопорфирина начинается с конденсации четырех молекул порфобилиногена, катализируемой *порфобилиноген-дезаминазой*; при этом постулируется образование промежуточного соединения — полипиррилметана, который превращается в уропорфириноген I. Этот бесцветный хромоген может либо претерпевать аутоокисление, образуя один из мочевых пигментов — уропорфирин I (рис. 22.4), либо декарбоксилироваться, образуя копропорфириноген I, который в свою очередь может окисляться в копропорфирин I. Возможен также другой путь превращений полипиррилметана; в присутствии *изомеразы* может образоваться уропорфириноген III, который сходным образом может превратиться в уропорфирин III, копропорфириноген III или копропорфирин III. Копропорфириноген III в результате окисления и декарбоксили-

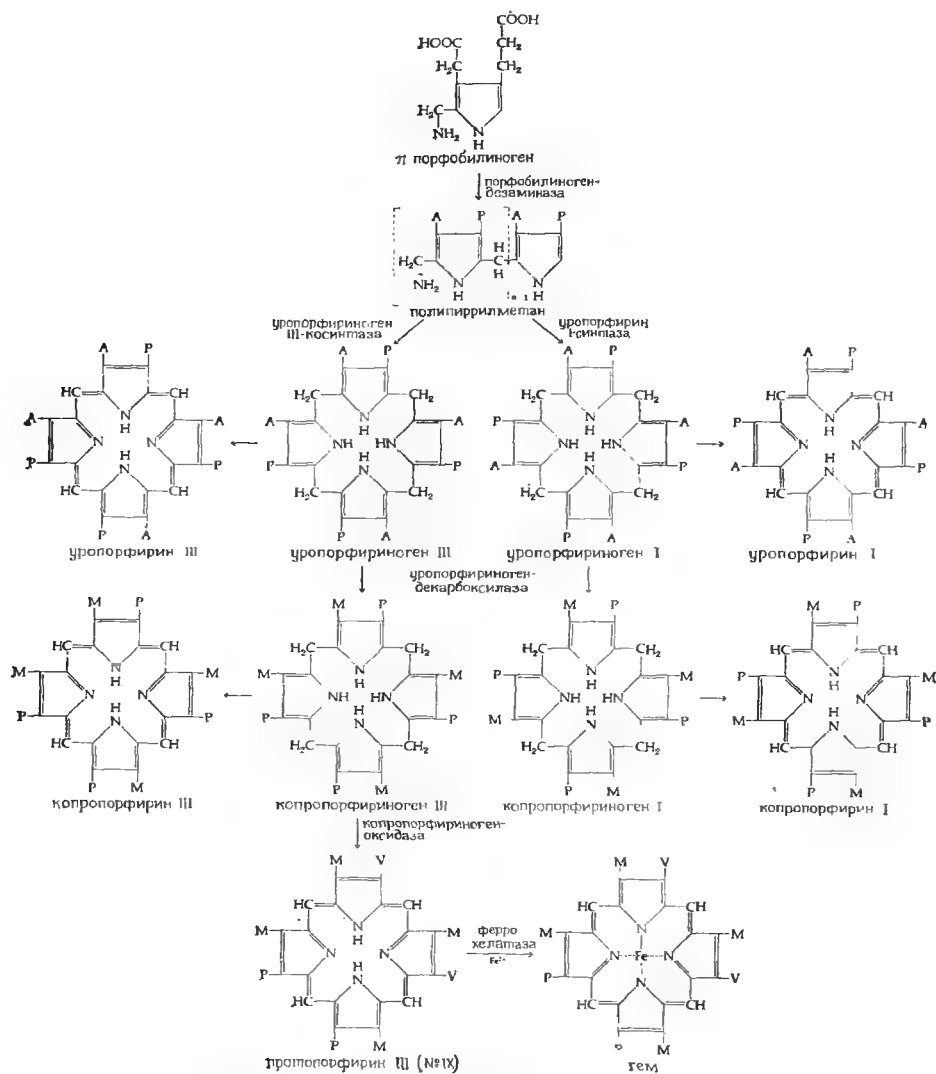


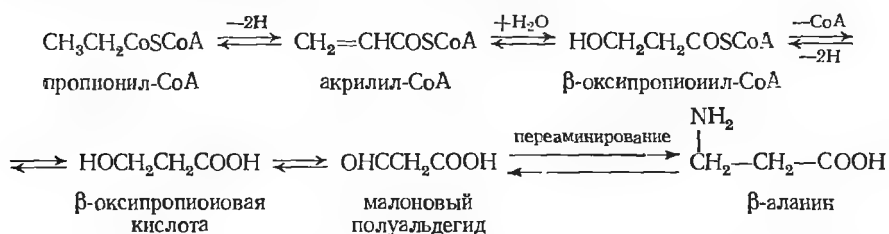
Рис. 22.4. Путь синтеза гема и других порфиринов из порфобилиногена. А — уксусная кислота; Р — пропионовая кислота; М — метил; V — винил.

В ходе последующего метаболизма γ -аминомасляная кислота вступает в реакцию переаминирования с α -кетоглутаратом, в результате образуется янтарный полуальдегид. Последний окисляется до сукцината, который вступает в цикл трикарбоновых кислот.

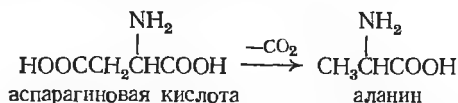
22.5.2. β -Аланин

Единственной β -аминокислотой, имеющей физиологическое значение, является β -аланин. Он содержится во многих тканях и в плазме в свободном виде, а также как фрагмент карнозина и ансерина (разд. 22.1.2.1) и в составе кофермента А как фрагмент пантотеновой кислоты.

Судя по структуре β -аланина, можно предполагать, что он образуется при декарбоксилировании аспарагиновой кислоты. Соответствующий фермент действительно имеется у некоторых микроорганизмов. У животных часть β -аланина образуется при деградации пиримидинов (разд. 24.2). Альтернативным и, по-видимому, наиболее важным является следующий путь:



Выделенная из микроорганизмов в кристаллическом виде аспартат- β -декарбоксилаза катализирует β -декарбоксилирование аспартата с образованием α -аланина



Этот фермент (M 660 000) состоит из 12 субъединиц, каждая из которых связывает молекулу пиридоксальфосфата.

22.5.3. Декарбоксилирование ароматических аминокислот

Неспецифическая декарбоксилаза ароматических L -аминокислот из тканей животных катализирует декарбоксилирование гистидина, тирозина, триптофана, фенилаланина, 3,4-диоксифенилала-

нина и 5-окситриптофана. Кроме того, имеются, по-видимому, декарбоксилазы, специфичные для некоторых ароматических аминокислот; вклад этих ферментов в процессы декарбоксилирования остается неясным.

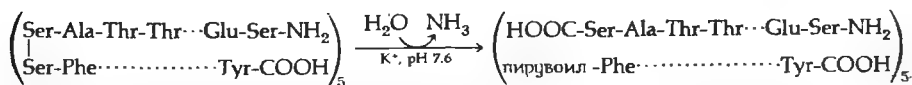
22.5.3.1. Гистамин

Неспецифическая декарбоксилаза ароматических аминокислот имеет низкую активность по отношению к гистидину. Специфичный фермент, имеющийся в тучных клетках — основном месте образования гистамина, является, вероятно, главным катализатором декарбоксилирования гистидина. Во многих других тканях, например легких, печени, мышцах и слизистой желудка, содержание этого амина также высокое вследствие его синтеза *in situ*.

Гистамин является мощным сосудорасширяющим агентом и при достаточно высоких концентрациях может вызывать сосудистый коллапс. Образование его происходит при травматическом шоке, а также в зоне воспалительного процесса. Гистамин стимулирует секрецию в желудке как пепсина, так и кислоты и применяется для исследования функции желудка. *Диаминоксидаза* — широко распространенный фермент — превращает гистамин в соответствующий альдегид и NH_3 ; часть неразрушенного гистамина экскретится с мочой в виде N-ацетильного и N¹-метильного производных; последнее является главным метаболитом гистамина у человека.

Дикий штамм *Lactobacillus* 30a продуцирует активную *гистидиндекарбоксилазу* (M 380 000), содержащую пять легко разделяемых субъединиц, причем каждая состоит из двух цепей. Большая цепь содержит необходимую для катализа пирувоильную группу (образующуюся из серина), блокирующую N-концевой остаток фенилаланина. Мутантный штамм этого микроорганизма продуцирует каталитически неактивный профермент, также имеющий M 380 000 и содержащий пять, по-видимому, идентичных субъединиц, но не имеющих пирувоильных групп. Этот профермент стабилен при pH ниже 6,5; в условиях инкубации при 37 °C и pH 7,6 он превращается в активный фермент. Кристаллический профермент активируется NH_4^+ или K^+ . При активации не происходит освобождения аминокислот или пептидов. В ходе активации с одинаковыми скоростями протекает ряд процессов: возрастание ферментативной активности, появление характерной двухцепочечной структуры активного фермента, образование пирувоильных остатков и освобождение стехиометрических количеств NH_3 .

В проферменте (но не в активном ферменте) имеется уникальный пептид с последовательностью Thr-Thr-Ala-Ser-Ser-Phe. Поскольку на C-конце малой цепи активного фермента находится последовательность Thr-Ala-Ser, а на N-конце большей цепи находится пирувоил Phe, то превращение профермента в активный фермент можно схематически представить следующим образом:



Природа мутации, приводящей к накоплению мутантом *Lactobacillus* профермента, а не активного фермента, неизвестна.

22.5.3.2. Окситирамин и родственные соединения

Специфичная гидроксилаза, называемая *тирозиной*, катализирует гидроксилирование тирозина в печени и меланинообразующих клетках с образованием 3,4-диоксифенилаланина (ДОФА). Последний затем декарбоксилируется *декарбоксилазой ароматических аминокислот*, в результате образуется диоксифенилэтиламин (*о*-окситирамин или дофамин), являющийся промежуточным соединением при образовании меланина (рис. 22.5). Декарбоксилаза имеется в почках и ткани надпочечников, а также в симпатических ганглиях и нервах. В печени активность неспецифической декарбоксилазы ароматических аминокислот ингибируется ДОФА, в то время как активность декарбоксилирующего фермента в других упомянутых выше тканях не изменяется при введении ДОФА. Это может иметь определенное значение, поскольку есть наблюдения, согласно которым эффективность *L*-ДОФА, широко применяемого в настоящее время при лечении болезни Паркинсона, увеличивается при систематическом введении. В результате ингибирования декарбоксилазной активности в печени и отсутствия подобного действия на фермент в мозге в этом органе происходит декарбоксилирование больших количеств *L*-ДОФА в дофамин — нейромедиатор ингибирующего типа, который, как полагают, является эффективным терапевтическим средством при болезни Паркинсона.

У людей и крыс после введения окситриптамина наблюдается выделение с мочой 3,4-диоксифенилуксусной кислоты и 3,4-диокси-

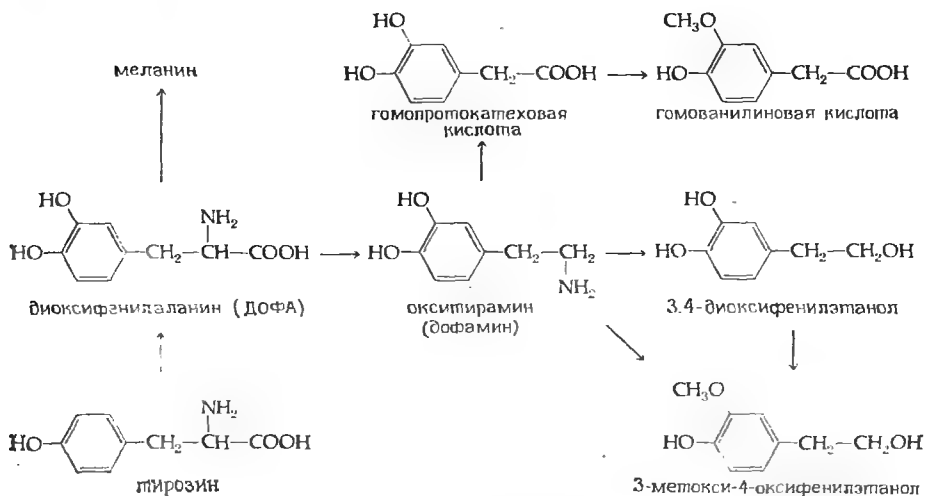


Рис. 22.5. Образование и превращения окситирамина и родственных соединений.

фенилэтанола, а также их метилированных производных — гомованилиновой кислоты и 3-метокси-4-оксифенилэтанола соответственно. Строение этих соединений приведено на рис. 22.5. ДОФА является также предшественником при биосинтезе норадреналина и адреналина (гл. 45) и при образовании меланина (разд. 23.2.11.1).

22.5.3.3. Производные триптофана

Декарбоксилаза ароматических аминокислот печени мало активна по отношению к триптофану. Образующийся продукт триптамин не обладает специфическим действием, но после окисления *моноаминоксидазой* образуется альдегид, который легко окисляется *альдегидоксидазой* в индолуксусную кислоту. Это соединение в небольших количествах имеется в нормальной моче, его экскреция увеличена у больных пеллагрой. Однако главный путь образования индолуксусной кислоты как в растениях, для которых она является *ауксином* (гормоном роста растений), так и у животных — это окислительное декарбоксилирование индолпириновинной кислоты, образующейся из триптофана в результате переаминирования.

Триптофан также подвергается гидроксилированию в 5-окситриптофан *триптофан-5-монооксигеназой*, находящейся в мозге. Фермент нуждается в восстанавливающем кофакторе — тетрагидроптеридине, который образуется в процессе реакции гидроксилирования, подобно тому как это происходит при функционировании фенилаланин-гидроксилазной ферментной системы в печени (разд. 21.4.2.4). В результате декарбоксилирования 5-окситриптофана под действием *5-окситриптофан-декарбоксилазы*, имеющейся в мозге, а также в почках, образуется 5-окситриптамин, или *серотонин*.

Значение серотонина как нейрогуморального фактора у человека рассматривается в гл. 37. Этот амин имеется также в ткани кишечника, тромбоцитах и тучных клетках; он является мощным сосудосуживающим агентом. Он входит также в состав многих ядов, например ядов ос и жаб. N-Метилированные производные серотонина, например буфотенин, весьма широко распространены у амфибий; они вызывают у млекопитающих нарушения деятельности центральной нервной системы.

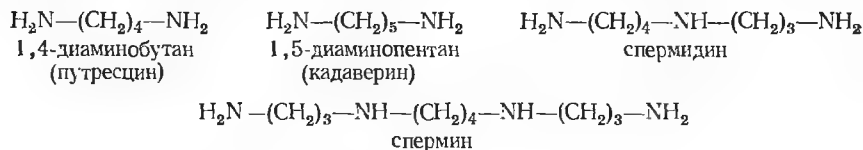
Серотонин и главные продукты его метаболизма — 5-оксиндолуксусная кислота и 5-метоксиндолуксусная кислота, экскретируются с мочой. Первая может образовываться в результате NAD-зависимого окисления 5-окситриптофала, который в свою очередь образуется из серотонина при действии *моноаминоксидазы*. Ингибирование метаболизма серотонина путем введения ингибиторов моноаминоксидазы приводит к увеличению образования N-ацетил- и N-метилпроизводных серотонина.

5-оксиндолуксусной кислоты; выделение этого соединения увеличивается также при нарушении метаболизма триптофана, известном как *болезнь Хартнупа* (разд. 23.2.15). Микросомы печени также катализируют гидроксилирование индолсодержащих соединений в соответствующие 6-оксипроизводные; возможное метаболическое значение этого процесса неизвестно. Некоторые из рассмотренных выше превращений приведены на рис. 22.6.

Известны многочисленные другие примеры декарбоксилирования аминокислот, и некоторые из них рассмотрены в других разделах книги. Не всегда, однако, декарбоксилированию подвергаются свободные аминокислоты. Так, декарбоксилирование серина происходит только тогда, когда он образует сложноэфирную связь, входя в состав фосфатидилсерина (разд. 18.1.2.1); в результате образуется фосфатидилэтаноламин. В известной мере сходным образом протекает образование кофермента А; в этом случае пантотевая кислота (гл. 50) образует пантоиламид цистеина, который затем фосфорилируется с образованием 4'-фосфопантетенна (разд. 24.1.9.3).

22.6. Биосинтез полиаминов

В живой природе широко распространены небольшие количества соединений, относящихся к группе полиаминов; эта группа включает следующие соединения:



22.6.1. Путресцин и кадаверин

Эти два амина образуются при бактериальном брожении из белков и давно известны из-за их неприятного запаха. Кадаверин образуется при декарбоксилировании лизина, а путресцин — при декарбоксилировании орнитина.

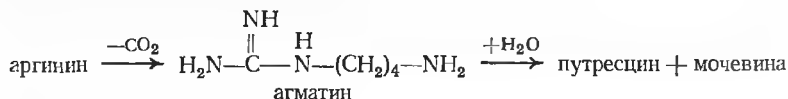
22.6.1.1. Путресцин

Исследования, проведенные как на клетках бактерий, так и на тканях млекопитающих, показывают, что биосинтез полиаминов является одним из наиболее ранних процессов, происходящих при пролиферации клеток. Из числа различных полиаминов путресцин представляет особый интерес, поскольку он ускоряет рост клеток как животных, так и бактерий и стимулирует синтез РНК.

Образование путресцина катализируется *орнитиндекарбокси-*

лазой — ферментом, определяющим скорость биосинтеза полиаминов (см. ниже). Среди ферментов млекопитающих этот фермент относится к числу тех, которые характеризуются наибольшей каталитической эффективностью (числом оборотов); его активность может повышаться гормонами, ускоряющими рост; содержание его увеличено в опухолевых клетках. Образующиеся из путресцина спермидин и спермин (см. ниже) оказывают ингибирующее действие на активность орнитиндекарбоксилазы по механизму обратной связи.

У *E. coli* синтез путресцина может осуществляться двумя путями — либо, как в клетках млекопитающих, в результате действия *орнитиндекарбоксилазы*, либо путем декарбоксилирования аргинина, катализируемого *аргининдекарбоксилазой*, с образованием агматина. Последний превращается в путресцин в ходе реакции, катализируемой агматин-уреогидролазой.



22.6.2. Спермидин и спермин

Оба эти амина являются постоянными компонентами клеток млекопитающих и во многих тканях находятся в весьма заметных количествах. Специфические функции этих аминов не установлены, однако их концентрации (так же как и путресцина) могут резко возрастать в период роста многих тканей, например при регенерации печени. Спермидин и спермин синтезируются многими микроорганизмами, однако для некоторых из них, например *Aspergillus nidulans* и *Hemophilus parainfluenzae*, они являются необходимыми факторами роста.

В общем эти полиамины выступают как факторы, которые стабилизируют структуру мембран. Так, у упомянутых выше микроорганизмов при отсутствии полиаминов повышается проницаемость клеточной мембраны в гипотонической среде и происходит утечка содержимого клеток. Протопласты (бактерии, лишённые клеточной оболочки) некоторых видов не выдерживают инкубации в гипотонической среде в отсутствие соединений группы полиаминов; не наблюдается также набухания митохондрий. Спермидин прочно связывается с ДНК и может способствовать стабилизации ее двухспиральной структуры.

Синтез спермидина наблюдали в печени, предстательной железе, а также у *E. coli*. После декарбоксилирования S-аденозилметионина S-аденозилметионин-декарбоксилазой (реакция 1, рис. 22.7) происходит необычная реакция, в результате которой углеродная цепь метионина (включая аминогруппу), а не метильная группа, как при переметилировании, переносится на пут-

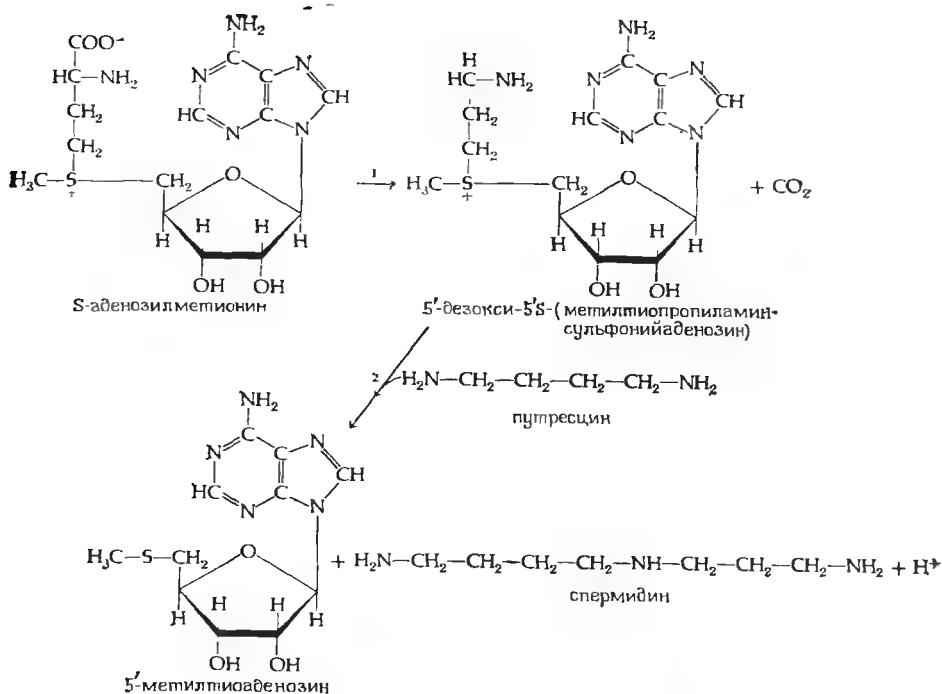


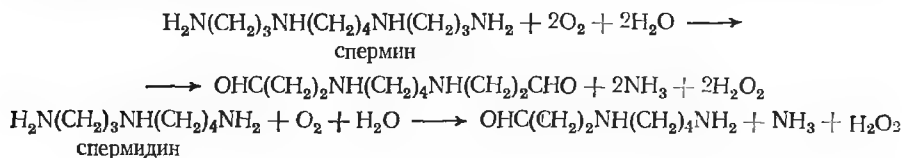
Рис. 22.7. Биосинтез спермидина; 1 — S-аденозилметионин-декарбоксилаза; 2 — аминопропилтрансфераза.

ресцин. Эти реакции приведены на рис. 22.7. 5'-Метилтиоаденозин, образующийся в ходе синтеза спермидина в предстательной железе, быстро подвергается дальнейшему превращению под действием фермента, катализирующего фосфоролитическое расщепление, приводящее к образованию аденина и 5-метилтиорибозо-1-фосфата. Спермин синтезируется в результате декарбоксилирования еще одной молекулы S-аденозилметионина и последующего переноса остающегося фрагмента метионина на спермидин; эта реакция катализируется *аминопропилтрансферазой*, которая отличается от фермента, катализирующего соответствующую реакцию при синтезе спермидина.

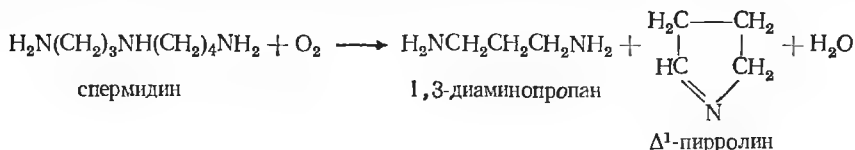
22.6.3. Метаболизм полиаминов

Метаболизм *путресцина* у млекопитающих не выяснен. У адаптированного штамма *Pseudomonas* из путресцина в результате окисления и переаминирования образуется янтарный полуальдегид; последний затем окисляется до сукцината, поступающего в цикл лимонной кислоты.

Окисление *спермина* и *спермидина*, как и ряда других моно- и диаминов, катализируется медьсодержащей *оксидазой*, которая была выделена в кристаллическом виде из плазмы быка и свиньи; мол. веса выделенных оксидаз соответственно равны (приблизительно) 225 000 и 195 000, а содержание меди составляет четыре и три атома на молекулу белка.



Окисление спермидина, катализируемое ферментом из *Serratia marcescens*, требующим FAD и дополнительного переносчика электронов, протекает по другому пути:



См. литературу к гл. 23.

Глава 23

МЕТАБОЛИЗМ АМИНОКИСЛОТ. IV

Гликогенные и кетогенные аминокислоты.

Метаболическая судьба индивидуальных аминокислот

Если аминокислоты поступают в печень в количествах, больших чем требуется для синтетических процессов, то избыток их не может откладываться в запас. В норме, однако, не происходит бесполезного выведения аминокислот; каждая из аминокислот подвергается деградации по такому пути, который позволяет аккумулировать (для последующего использования) значительную долю энергии полного окисления аминокислоты. Рассмотрение этих путей является главной задачей данной главы. В результате происходящих превращений большая часть углеродных атомов аминокислот оказывается в составе либо пирувата, либо ацетил-СоА и таким образом включается в процессы метаболизма, характерные для углеводов и жирных кислот. В некоторых случаях, однако, в ходе деградации образуются метаболиты, которые имеют специфические метаболические функции. Некоторые из них были рассмотрены в гл. 20—22, другие встретятся ниже при рассмотрении судьбы индивидуальных аминокислот.

Деградация аминокислот не играет существенной роли в жизни фотосинтезирующих бактерий, которые синтезируют аминокислоты со скоростью, соответствующей потребностям роста; подобная ситуация характерна также и для культуры бактерий на среде, обеспечивающей рост. Многие микроорганизмы могут расти, однако, на среде, в которой основным источником углерода являются одна или несколько аминокислот, из них образуются все вещества, необходимые для жизни. У таких микроорганизмов (особенно псевдомонад) метаболические пути превращений аминокислот аналогичны тем, которые осуществляются в печени позвоночных. Некоторые примеры таких путей будут приведены ниже.

23.1. Гликогенные и кетогенные аминокислоты

Превращение аминокислот в предшественники углеводов и, следовательно, потенциально либо в глюкозу и гликоген, либо в ке-

тоновые тела, было изучено на животных в состоянии голодания, с экспериментальным диабетом или получавших флоридзин. В последних двух случаях после введения аминокислоты увеличивалась экскреция почками либо глюкозы, либо кетоновых тел; в опытах на голодающих животных можно выяснить, приводит ли введение аминокислоты к увеличению содержания гликогена в печени.

Превращения, которые приводят к образованию пировиноградной, щавелевоуксусной или α -кетоглутаровой кислот, обеспечивают возможность образования гликогена; в то же время пути, приводящие к ацетил-СоА или ацетоацетату, называют *кетогенными*, поскольку их конечными продуктами являются ацетоацетат и ацетон, причем последний образуется при декарбоксилировании перового. Пути гликогенеза (гл. 15) и кетогенеза (гл. 17) были описаны выше. На основе приведенных данных можно, следовательно, выделить группу гликогенных, а также группу кетогенных аминокислот (табл. 23.1).

Таблица 23.1

Гликогенные и кетогенные аминокислоты

Гликогенные		Кетогенные	Гликогенные и кетогенные
Аланин	Гистидин	Лейцин	Изолейцин
Аргинин	Оксипролин		Лизин
Аспарагин	Метионин		Фенилаланин
Аспарагиновая кислота	Пролин		Тирозин
Цистин	Серин		
Глутаминовая кислота	Тренин		
Глутамин	Триптофан		
Глицин	Валин		

Начальной стадией метаболизма большинства аминокислот является удаление α -аминогруппы путем переаминирования (разд. 20.3.2) или окисления (разд. 21.4.3). Поэтому в последующем обсуждении будет рассматриваться в основном судьба соответствующей α -кетокислоты.

23.2. Метаболическая судьба индивидуальных аминокислот

23.2.1. Аланин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты

В результате удаления α -аминогруппы у каждой из этих трех аминокислот образуются α -кетокислоты — промежуточные продук-

ты цикла трикарбоновых кислот. Глутаминовая кислота может вступить в переаминирование со многими кетокислотами (разд. 21.4.1) или подвергнуться окислению в митохондриях глутаматдегидрогеназой (разд. 21.4.3.1); из аспарагиновой кислоты и аланина в результате переаминирования образуются оксалоацетат и пируват соответственно. Превращения образовавшихся α -кетокислот протекают по рассмотренным выше путям.

23.2.2. Орнитин, пролин и оксипролин

Орнитин и пролин, исходным соединением для образования которых является глутаминовая кислота (разд. 21.4.3), могут снова превратиться в нее. Окисление пролина до Δ^1 -пирролин-5-карбоновой кислоты происходит под действием *пролиноксидазы* митохондрий; этот фермент отличен от NADPH-зависимой редуктазы, участвующей в образовании пролина (разд. 20.3.2.5). Далее в результате гидролиза образуется глутамилполуальдегид; он может образоваться также из орнитина путем переаминирования. Окисление до глутаминовой кислоты завершает последовательность превращений.

Оксипролин окисляется в печени микросомальной цитохромзависимой оксидазой, а в почках оксидазой L-аминокислот в Δ^1 -пирролин-3-окси-5-карбоновую кислоту; из нее в результате реакций,

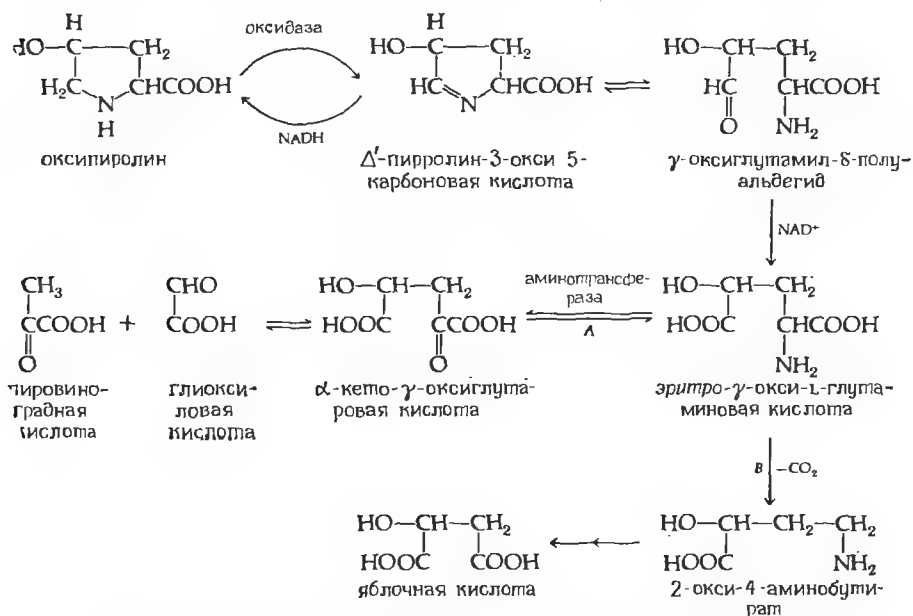


Рис. 23.1. Метаболические превращения оксипролина млекопитающих.

аналогичных тем, которые осуществляются в ходе метаболизма пролина, образуется *эритро*-L- γ -оксиглутамат. Далее в результате переаминирования образуется α -кето- γ -оксиглутарат; в ходе реакции альдолазного типа он расщепляется на глиоксильную и пировиноградную кислоты (рис. 23.1, путь A). Судьба глиоксильной кислоты описана ниже (разд. 23.2.6). В мозге оксиглутамат декарбоксилируется до 2-окси-4-аминобутирата, из которого далее образуется малат (путь B).

В единственном сообщении приводятся данные о том, что у двенадцатилетней девочки (у которой наблюдалась задержка умственного развития) из-за недостаточности фермента, осуществляющего окисление оксипролина в Δ^1 -пирролин-3-окси-5-карбоновую кислоту, концентрация свободного оксипролина в плазме и моче была увеличена по сравнению с нормой в 20—40 раз. Выведение оксипролина с мочой может увеличиваться при состояниях, характеризующихся ускоренным обновлением коллагена, например при быстром росте костей у детей или при заболеваниях, влияющих на метаболизм коллагена.

23.2.3. Глутамин

Глутамин превращается в глутаминовую кислоту и NH_3 под действием *глутаминазы* (разд. 21.4.3.2). Описаны два изофермента глутаминазы, один из которых является фосфатзависимым. Эти изоферменты широко распространены.

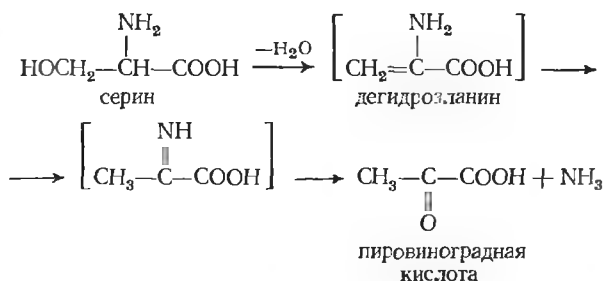
Интерес к превращениям глутамина обусловлен рядом обстоятельств: 1. Положение равновесия глутаматдегидрогеназной реакции сильно смещено в направлении синтеза глутамата, поэтому неясно, может ли глутамат служить столь же эффективным, как глутамин, источником NH_4^+ . 2. Функционирование глутаминазы почек способствует удержанию в организме катионов и поддержанию нормальной концентрации водородных ионов в жидкостях организма. Роль глутамина и глутаминазы рассматривается в гл. 33. Глутамин, выступая в качестве донора амидного азота, участвует в синтезе различных соединений, в частности пуринов и пиримидинов (гл. 24), гексозаминов (гл. 15) и некоторых аминокислот (гл. 21).

23.2.4. Аспарагин

По имеющимся данным, аспарагин функционирует в следующих процессах: 1) в синтезе белка, 2) в образовании аспартата и NH_3 (под действием *аспарагиназы*) и 3) в переаминировании с α -кетосукцинамовой кислотой. Не имеется сведений об участии аспарагина в переносе амидного азота в реакциях, подобных тем, которые характерны для глутаминна.

23.2.5. Серин

Превращение серина в глицин и N⁵,¹⁰-метилентетрагидрофолат было описано выше (разд. 21.4.2.8). Главное превращение, которое претерпевает серин, — это α,β-дегидратация, катализируемая ферментом, называемым *серин-треонин-дегидратазой*, поскольку субстратами для фермента млекопитающих являются обе аминокислоты:



Высокоочищенная дегидратаза (M 98 000), выделенная из печени овцы, состоит из двух неидентичных субъединиц (M 41 000 и 47 000). Меньшая субъединица ковалентно связана со своим коферментом, идентифицированным как α-кетомасляная кислота. Последняя, вероятно, образует шиффово основание с аминокислотой — субстратом. Этот фермент, следовательно, подобен гистидиндекарбоксилазе (разд. 22.5.3.1), уроканазе (разд. 23.2.14) и ряду других ферментов обмена аминокислот в том отношении, что он содержит карбонильный кофактор, не являющийся пиридоксальфосфатом.

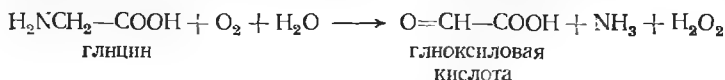
Активность серин-треонин-дегидратазы печени увеличивается после введения глюкогона (гл. 46) или кортикостероидов (гл. 45).

Дегградация серина может осуществляться также путем переаминирования с образованием β-оксипировиноградной кислоты; из последней могут образоваться глюкоза и гликоген (разд. 21.4.2.4). Участие серина в синтезе цистенна (разд. 21.4.2.3), триптофана (разд. 20.4.1.11) и липидов (разд. 18.1.2.1) было рассмотрено выше.

23.2.6. Глицин

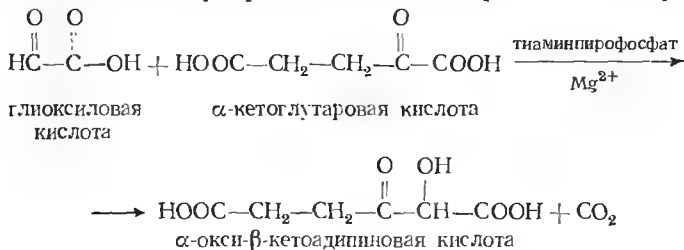
Главным путем метаболизма глицина является катализируемое *глицин-синтазой* обратимое превращение, в результате которого образуется N⁵,¹⁰-метилентетрагидрофолат и освобождаются CO₂ и NH₃. Кроме того, глицин может превращаться в серин, разд. 21.4.2.6, а затем в пироват.

В реакции, катализируемой *глицин-оксидазой* (оксидазой D-аминокислот), образуется глиоксиловая кислота:



Глиоксиловая кислота относится к числу метаболитов, участвующих во многих реакциях у млекопитающих и других организмов (разд. 24.2.1.6). При окислении ее образуется щавелевая кислота; это превращение представляет интерес в связи с врожденным заболеванием — *первичной оксалурией*, при котором наблюдается увеличенное образование оксалата, сопровождающееся прогрессирующим отложением оксалата кальция в почках и других тканях; возникающие при этом функциональные нарушения могут приводить к гибели в раннем возрасте.

Помимо глиоксилата единственным другим известным предшественником оксалата у человека является аскорбиновая кислота. Не имеется, однако, данных о нарушениях метаболизма аскорбиновой кислоты, приводящих к оксалурии. Увеличение образования оксалата, по-видимому, обусловлено снижением (по сравнению с нормой) утилизации глиоксилата по другим путям. Один из таких путей обычного превращения глиоксилата, который, вероятно, сильно тормозится у некоторых индивидуумов с первичной оксалурией, — это α -кетоглутарат-глиоксилат-карболигазная реакция:



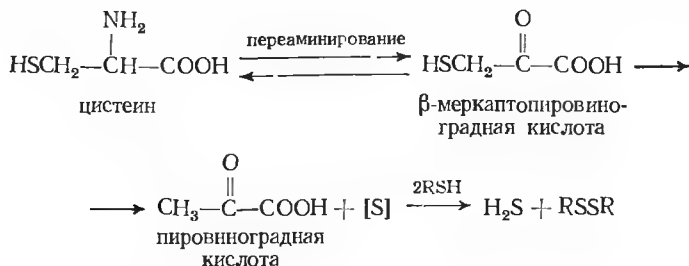
23.2.7. Цистеин

Конечная судьба цистеина в метаболизме — это образование неорганического сульфата и пирувата. Начальными стадиями соответствующих путей являются: 1) удаление аминогруппы путем переаминирования, 2) окисление связанной серы и 3) одновременное удаление как серы, так и аминогруппы. Эти пути приведены на рис. 23.2.

23.2.7.1. Переаминирование

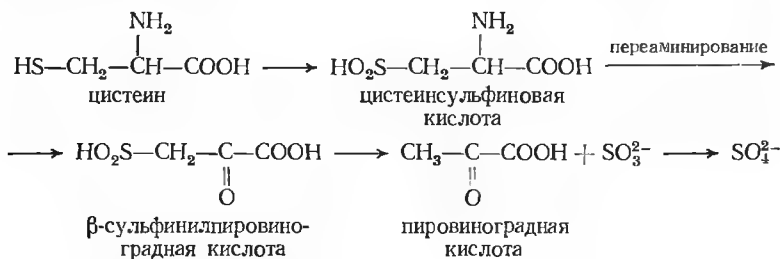
Переаминирование цистеина в печени и у некоторых бактерий приводит к образованию β -меркаптопировиноградной кислоты, из

которой после десульфирования образуется пировиноградная кислота. При наличии восстанавливающих агентов, например глутатиона (RSH , далее), сера может освобождаться в виде H_2S .



23.2.7.2. Окислительный путь

Главный путь катаболизма цистеина у животных — окисление: в цистеинсульфиновую кислоту. Реакция катализируется Fe^{2+} -содержащей диоксигеназой. Оба атома кислорода сульфоновой кислоты поступают из O_2 :

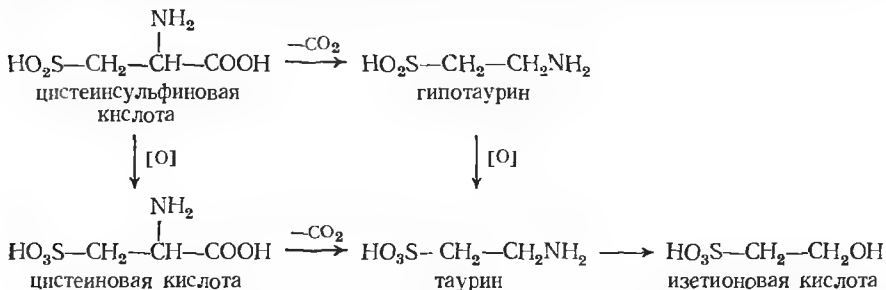


Цистеинсульфиновая кислота вступает в переаминирование с α -кетоглутаратом при участии аспартат-аминотрансферазы; при этом образуются пировиноградная кислота и сульфит. Было также описано прямое десульфирование цистеинсульфиновой кислоты, катализируемое ферментным препаратом из печени, приводящее к образованию аланина и сульфита. SO_3^{2-} окисляется далее до SO_4^{2-} , как описано ниже.

Сульфат — конечная форма, в которой экскретируется потребляемая сера, — используется также для синтеза 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфата (разд. 20.4.1), который участвует в синтезе различных эфиров сульфата.

Цистеинсульфиновая кислота используется также для синтеза ряда серосодержащих соединений, в том числе таурина и изетионовой кислоты — нормального метаболита таурина. Изетионовая кислота находится в большом количестве в нервной ткани, однако роль ее неизвестна.

Таурин участвует в образовании таурохолевой кислоты (компонент желчи, гл. 34). Синтез таурина в печени протекает двумя путями; главным является, по-видимому, путь через гипотаурин.



Тиоэтиламин (цистамин), образующийся из цистеина и входящий в состав CoA (разд. 12.2.1), освобождается при гидролизе этого кофермента. При окислении тиоэтиламина сначала образуется гипотаурин, а затем таурин.

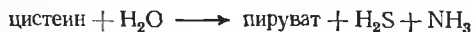
23.2.7.3. Удаление серы

Десульфуривание β -меркаптопирувата, образующегося из цистеина в результате переаминирования, может осуществляться под действием (разд. 23.2.7) цитоплазматической β -меркаптопируват-транссульфуразы, имеющейся в большинстве органов, особенно в печени и почках. Этот фермент катализирует перенос атома серы от меркаптопирувата на такие нуклеофилы, как SO_3^{2-} , CN^- и RSH , с образованием $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SCN^- и $\text{R}-\text{S}-\text{SH}$ соответственно. В условиях избытка тиола $\text{RS}-\text{SH}$ восстанавливается с образованием H_2S и дисульфида. Кроме того, подобное транссульфуривание осуществляется между меркаптопируватом и двумя сульфидинами, имеющимися в тканях животных, а именно аланин-сульфинатом (цистеин-сульфинатом) и гипотаурином (разд. 23.2.7.2) с образованием соответствующих тиосульфонов — аланин-тиосульфоната (тиоцистеата) и тиотаурина (рис. 23.2).

В тканях животных имеется другая переносящая серу трансфераза, *тиосульфат-сульфидтрансфераза* (роданеза) (M 37 000); она локализована в митохондриях. Фермент катализирует перенос двухвалентной серы от различных доноров, например тиосульфата и органических пересульфидов, но такие акцепторы, как сульфит (с образованием тиосульфата) и цианид (с образованием тиоцианида). Было показано, что функционирование этого фермента имеет важное физиологическое значение, например при детоксикации цианида с образованием тиоцианата.

В некоторых бактериях под действием *цистеиндесульфгидразы* цистеин может расщепляться до пирувата, NH_3 и H_2S . Промежу-

точным соединением в этой реакции, по-видимому, является дегидроаланин. В тканях животных не было обнаружено специфической *цистеиндесульфгидразы*. Локализованная в печени *цистатионин-γ-лиаза* (разд. 21.4.2.3) может также катализировать десульфгидрирование цистенна; физиологическое значение этой реакции остается невыясненным.



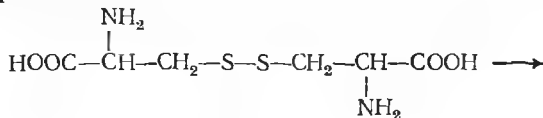
Сульфид может окисляться в печени и почках до SO_3^{2-} и SO_4^{2-} ; соответствующая ферментная система, по-видимому, локализована в митохондриях. Механизм превращения сульфида в сульфит в тканях животных не выяснен. Окисление сульфита в сульфат катализируется митохондриальной *сульфитоксидазой*. Каждая субъединица (M 55 000) фермента из печени быка, крысы и курицы содержит один атом молибдена и одну молекулу протогема (разд. 13.4); фермент может находиться как в состоянии мономера, так и димера. Фермент катализирует процесс переноса электронов от сульфита на различные акцепторы — O_2 , цитохром c и феррицианид. Восстановление O_2 до H_2O_2 осуществляется по типу двухэлектронного процесса. В митохондриях окисление сульфита связано с дыхательной цепью на уровне цитохрома c , поэтому окисление сульфита характеризуется коэффициентом P/O , равным 1.

О важности процесса окисления сульфита в ходе нормального метаболизма человека свидетельствуют нарушения обмена у детей, в печени и почках которых отсутствует сульфитоксидаза. В их моче содержатся большие количества тиосульфата и сульфита, но практически отсутствует сульфат. Начиная с рождения, у таких детей проявляются выраженные неврологические нарушения, которые прогрессивно нарастают и в возрасте 9 месяцев завершаются гибелью. Поскольку в тканях и моче больных детей не наблюдается изменения уровня ряда сульфатных эфиров, можно полагать, что патологический эффект обусловлен не недостатком сульфата, а накоплением сульфита и (или) продуктов его превращения.

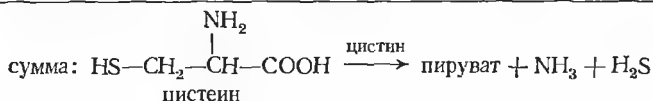
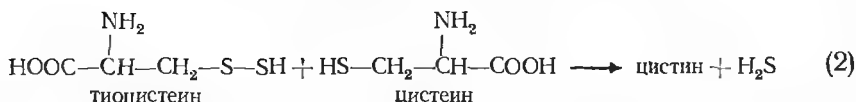
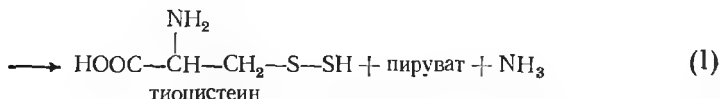
Неорганический сульфат и его эфиры являются главными продуктами метаболизма серы; при этом на долю неорганического сульфата приходится около 80% всей серы в суточной моче. Остальная часть приходится на долю сульфатных эфиров различных метаболитов, например стероидов, оксиароматических соединений, олигосахаридов, а также на органическую серу (цистин и таурин, см. ниже).

В печени осуществляются и другие пути метаболизма цистенна, но они имеют меньшее значение. Пиридоксальфосфат зависящая *цистатионин-γ-синтаза* наряду с реакцией, приведенной в разд. 20.4.1.4, катализирует также превращение цистатинонина в

гомосерин и цистеин (как у млекопитающих, так и у микроорганизмов). В присутствии цистина этот фермент катализирует еще одну серию реакций:



цистин



Известны три наследственных нарушения метаболизма цистина, а именно цистинурия, цистатионинурия и гомоцистинурия. *Цистинурия* характеризуется ненормально высокой экскрецией с мочой цистина (гл. 35), а также ряда диаминокислот и обусловлена дефектом транспортной системы почек, заключающимся в недостаточной канальцевой реабсорбции этих аминокислот; их транспорт через стенку кишечника также нарушен.

Цистатионинурия наблюдается при дисбалансе реакций, катализируемых цистатионин-синтазой и цистатионазой (разд. 21.4.2.3). Можно выделить два типа цистатионинурии: один из них связан с увеличенным синтезом цистатионина, а другой с его уменьшенной деградацией. Скорость синтеза цистатионина зависит от доступности субстрата — гомоцистеина (разд. 21.4.2.3), а также от концентрации в тканях цистатионин-синтазы. У больных с недостаточностью N⁵-метилтетрагидрофолат-гомоцистеин — метилтрансферазы (разд. 21.4.2.8) возникающий избыток гомоцистеина приводит к накоплению цистатионина. Второй тип цистатионинурии связан с уменьшением активности цистатионазы, которое наблюдается при дефиците витамина В₆; при этом следует, однако, отметить, что как цистатионин-синтаза, так и цистатионаза являются пиридоксальфосфатзависимыми ферментами. Генетическая дефектность апофермента может проявляться как в уменьшении эффективности связывания кофермента, так и в неспособности холофермента катализировать реакцию.

Гомоцистинурия возникает в результате нарушений метаболизма гомоцистеина, связанных с одним из наследственных дефектов,

при котором замедляется протекание N^5 -метилтетрагидрофолат-гомоцистеин — метилтрансферазной реакции (разд. 21.4.2.8). Возможны следующие причины: 1) дефект в синтезе апофермента, 2) недостаточный синтез субстрата — метилтетрагидрофолата, 3) неадекватная концентрация активной формы кофермента — метил-витамина B_{12} (гл. 50) и 4) недостаточная активность $N^5, 10$ -метилентетрагидрофолатредуктазы (разд. 21.2.4.9). Поскольку фермент необходим для синтеза метилтетрагидрофолата, в последнем случае возникает, вероятно, «вторичный» недостаток субстрата для метилтрансферазной реакции.

23.2.8. Метионин

Некоторые из главных реакций метаболизма метионина приведены на рис. 23.3. Наиболее важные пути метионина в метабо-

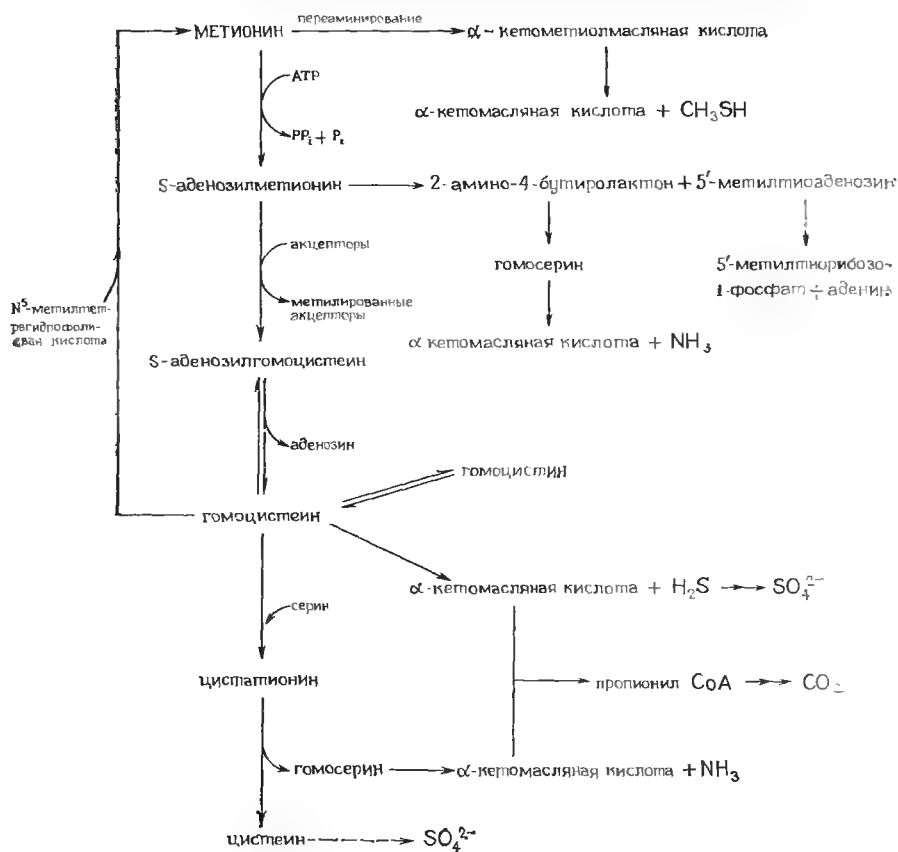
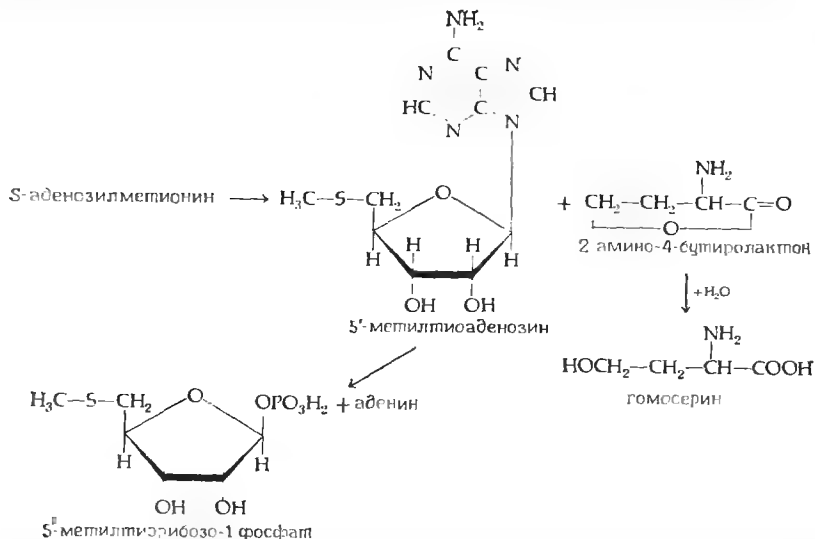


Рис. 23.3. Некоторые реакции метаболизма метионина.

лизме следующие: 1) использование для синтеза белка, 2) превращение в *S*-аденозилметионин — главный донор метильных групп (разд. 21.4.2.9) и 3) превращение (в процессе пересульфуривания) в цистатионин, цистеин и другие серосодержащие соединения. Два последних пути взаимосвязаны: метионин превращается последовательно в *S*-аденозилметионин, *S*-аденозилгомоцистеин и гомоцистеин. Последний может необратимо превращаться в цистатионин, который расщепляется до α -кетомасляной кислоты и цистеина (разд. 21.4.2.3). Окислительное декарбоксилирование α -кетомасляной кислоты приводит к образованию пропионил-CoA, последующий метаболизм которого был рассмотрен выше (разд 17.5.9).

Метионин может непосредственно превращаться в α -кетобутират, NH_3 и метилмеркаптан; процесс такого типа был показан на ферментных препаратах из бактерий и печени. Сначала метионин в результате персаминирования превращается в α -кето- γ -метилтиомасляную кислоту, из последней затем образуются α -кетобутират и метилмеркаптан.

У млекопитающих дополнительный путь катаболизма *S*-аденозилметионина катализируется *5'*-метилтиоаденозин-фосфорилазой. Этот путь представляет собой двухстадийную реакцию; вначале образуется 2-амино-4-бутиролактон и *5'*-метилтиоаденозин (последний образуется также при синтезе спермидина, в этом синтезе участвует *S*-аденозилметионин, рис. 22.7). Метилтиоаденозин расщепляется затем на *5'*-метилтиорибозу-1-фосфат и аденин.

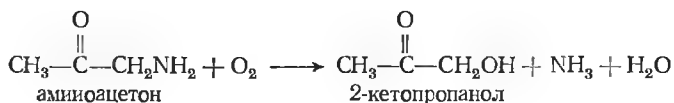


Каталитический комплекс, вероятно, состоит из двух ферментов — *S*-аденозилметионин-алкилтрансферазы и метилтиоаденозин-фос-

форилазы. При гидролизе аминокислот образуется гомосерин, который в результате реакции, катализируемой цистатионазой (разд. 21.4.2.3), превращается в α -кетобутират и NH_3 .

23.2.9. Треонин

Известны три следующие реакции деградации треонина у млекопитающих: 1) превращение в α -кетомасляную кислоту под действием *серин-треонин-дегидратазы* (разд. 21.4.3.1), 2) расщепление до глицина и ацетальдегида под действием *треонин-альдолазы* и 3) дегидрирование и декарбоксилирование с образованием аминокетона. Скорость первой реакции в печени увеличивается после скармливания треонина или инъекции кортикостероидов. Образующийся во второй реакции ацетальдегид, окисляясь до ацетата, является источником ацетил-КоА. Третья реакция катализируется ферментными препаратами из печени млекопитающих и земноводных; предполагаемым промежуточным соединением является 2-амино-3-кетобутират, который, вероятно, претерпевает спонтанное декарбоксилирование. Аминокетон превращается в 2-кетопропанол под действием либо *аминоксидазы*, либо *трансаминазы*:



2-Кетопропанол превращается либо в пируват под действием дегидрогеназы (NADP- или NAD-зависимая), либо в D-лактат под действием *глиоксалазы*. Превращение, в ходе которого образуется аминокетон, является важным путем метаболизма метионина у позвоночных.

Превращение треонина, ведущее через α -кетобутират (первая из приведенных выше реакций) к пропионил-КоА, создает потенциальную возможность поступления трех (из четырех) углеродных атомов треонина в глюкозу, в то время как в результате треонин-альдолазной реакции два углеродных атома могут поступить в глюкозу (через глицин) и два углеродных атома — в кетонные тела (через ацетальдегид). Однако *in vivo* образования кетонных тел из метионина не наблюдалось.

Треониндегидратаза из *E. coli* аллостерически активируется AMP, а из *Clostridia* — ADP. Для последнего организма треонин может служить главным источником энергии роста; при этом из треонина образуется пропионил-КоА (через стадию α -кетоглутарата); далее происходит образование пропионилфосфата, а затем при участии ADP и ацилкиназы образуется АТР. Таким образом, накопление ADP в клетках *Clostridia* увеличивает скорость первой (по-видимому, лимитирующей) реакции катаболизма треонина, обеспечивающей синтез АТР.

23.2.10. Превращения валина, лейцина и изолейцина

Катаболическая судьба алифатических аминокислот с разветвленной боковой цепью — валина, лейцина и изолейцина имеет ряд сходных черт. В результате первоначально происходящего переаминирования образуются соответствующие α -кетокислоты; далее окислительное декарбоксилирование приводит к ацил-СоА-производным, содержащим на один углеродный атом меньше, чем исходная аминокислота. Последующие реакции (для всех рассматриваемых аминокислот) подобны тем, которые осуществляются при окислении жирных кислот.

Окисление *валина* (рис. 23.4) приводит к метилмалонил-СоА, который превращается в сукцинил-СоА (разд. 17.5.9), последний либо полностью окисляется, либо поставляет три углеродных атома для глюконеогенеза. Переаминирование метилмалонилполуальдегида (рис. 23.4) приводит к образованию β -аминоизомасляной кислоты, которая является также продуктом метаболизма пиримидинов (разд. 24.2.1.7). Экскреция β -аминоизомасляной кислоты с мочой у некоторых индивидуумов может достигать 200—300 мг в сутки либо вследствие наследственного дефекта, либо заболевания.

Окисление *лейцина*, как показано на рис. 23.5, завершается образованием одной молекулы ацетоуксусной кислоты и одной молекулы ацетил-СоА; это согласуется с данными о том, что у животных с экспериментальным диабетом из 1 моль лейцина образуется 1,5 моль ацетоуксусной кислоты. Превращение β -метилкротонил-СоА в β -метилглутарил-СоА является биотинзависимой реакцией, сходной по механизму с другими реакциями, в ходе которых происходит образование биотин-СО₂ (разд. 14.5). Примечательным является также образование 3-окси-3-метилглутарил-СоА — ключевого промежуточного соединения при синтезе стероидов из ацетил-СоА (разд. 18.3.1).

Метаболизм *изолейцина* завершается образованием одной молекулы ацетил-СоА и одной молекулы пропионил-СоА (рис. 23.6); это согласуется с экспериментальными данными о том, что изолейцин является одновременно и слабо гликогенной и слабо кетогенной аминокислотой.

Врожденная аномалия метаболизма валина, лейцина и изолейцина из-за характерного запаха мочи получила название болезни «моча с запахом кленового сиропа». Быстрое нарастание расстройств при этой болезни наблюдается в течение первых месяцев жизни ребенка. Некоторые больные дети могут жить несколько лет; у них, однако, наблюдается выраженная задержка умственного развития; при аутопсии видны обширные нарушения миелинизации. Запах мочи обусловлен тремя кетокислотами, образующимися из трех рассматриваемых аминокислот. Переами-

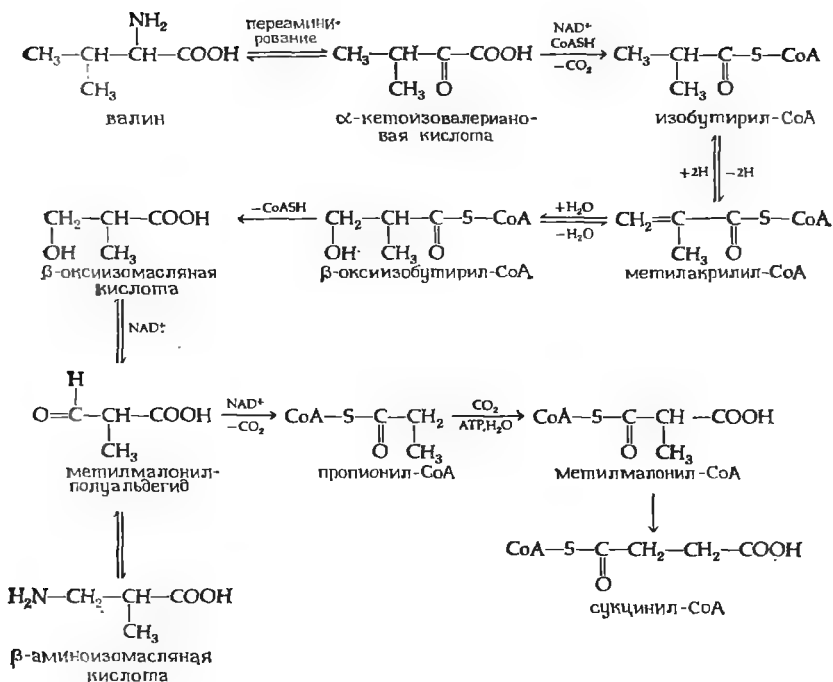


Рис. 23.4. Метаболические превращения валина.

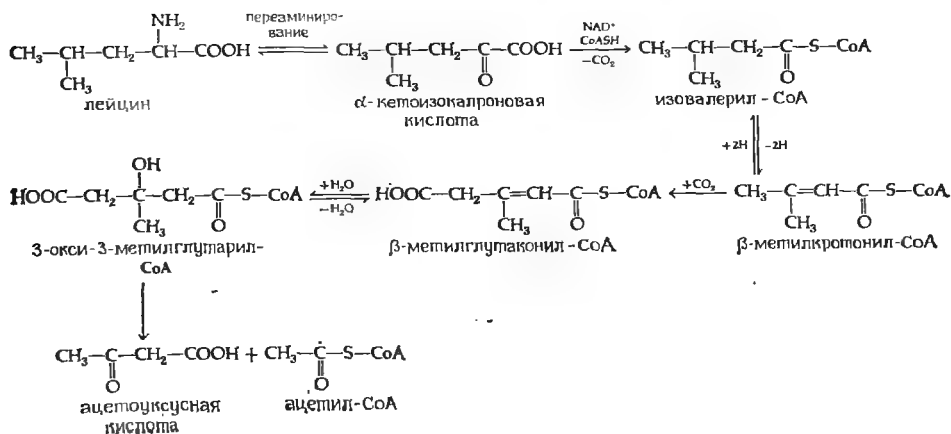


Рис. 23.5. Метаболические превращения лейцина.

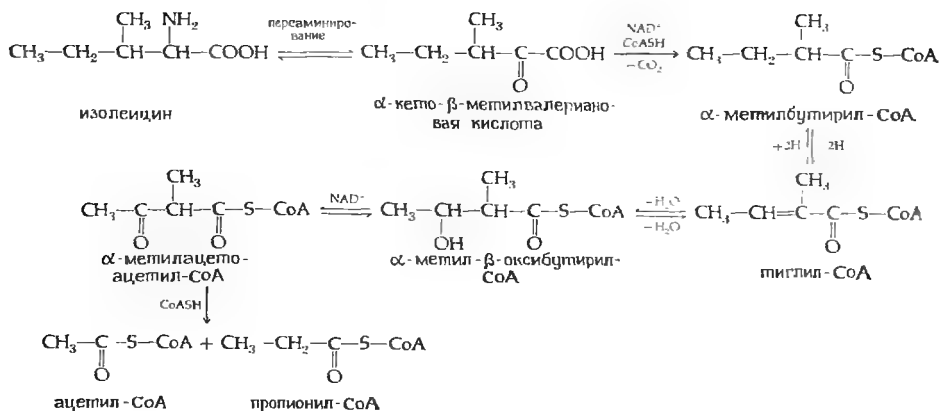


Рис. 23.6. Метаболические превращения изолейцина.

нирование не нарушается, однако не происходит последующего окислительного декарбоксилирования с образованием ацил-CoA. То обстоятельство, что при данном синдроме накапливаются все три кетокислоты, свидетельствует о том, что окисление всех трех кетокислот осуществляется одним и тем же ферментом и что не имеется другого существенного пути их метаболизма. В нормальной печени обнаружена аминотрансфераза, специфичная к лейцину.

Другое метаболическое нарушение, *изовалератацидемия*, по-видимому, специфично для метаболизма лейцина; оно характеризуется высоким содержанием в плазме крови изовалериановой кислоты. Эта болезнь может оказаться фатальной; в тех случаях, когда не проводится лечение, наблюдаются задержка умственного развития и приступы судорог. В период ремиссии образовавшаяся из лейцина изовалериановая кислота экскретируется в виде конъюгатов с глицином. Наблюдаемые метаболические нарушения связывают с неадекватным функционированием дегидрогеназы, катализирующей превращение изовалерил-CoA в β -метилкротонил-CoA (рис. 23.5).

23.2.11. Фенилаланин и тирозин

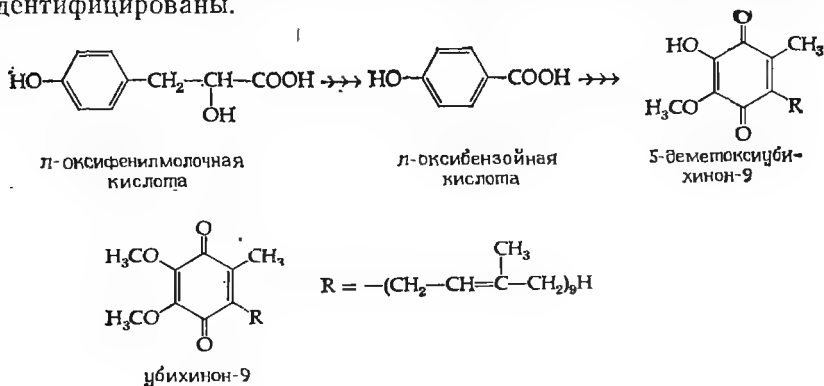
У здоровых людей почти весь фенилаланин, который не был использован для синтеза белка, превращается в печени в тирозин под действием фенилаланин-гидроксилазы (разд. 21.1.2). При фенилкетонурии (разд. 21.4.2.4) метаболизм фенилаланина отклоняется в направлении образования фенилпировиноградной кислоты, которая либо накапливается, либо восстанавливается до фенилмолочной кислоты; небольшая доля последней окисляется в фенилуксусную кислоту, которая экскретируется в виде фенилацетил-глутаминна. Пути метаболизма фенилаланина и тирозина приведены на рис. 23.7.

но отчасти объяснить экскрецию с мочой относительно больших количеств метаболитов фенилмолочной кислоты, образующихся при действии *редуктазы ароматических α-кетокислот* у преждевременно родившихся детей или у нормальных младенцев, которые получали тирозин. Для нормальной активности *n*-оксифенилпироват-диоксигеназы, по-видимому, необходима аскорбиновая кислота, так как в условиях недостатка последней морские свинки и младенцы экскретируют значительные количества *n*-оксифенилпировиноградной кислоты.

Окисление гомогентизиновой кислоты катализируется *гомогентизат-диоксигеназой*, для активности которой необходимы Fe^{2+} и высокие концентрации сульфгидрильных соединений, например восстановленного глутатиона. В реакции участвует молекулярный кислород; происходит расщепление ароматического кольца между боковой цепью и соседней гидроксидной группой; при этом один из атомов кислорода оказывается карбонильным кислородом в положении 3 продукта, малеилацетоацетата, а другой входит в состав карбоксильной группы.

Исследование превращения фенилаланина в ацетоацетат с помощью изотопной техники показало что: 1) α-углеродный атом (*) (см. рис. 23.7) фенилаланина становится углеродным атомом карбоксильной группы ацетоацетата; 2) углерод-2 ароматического кольца (X) является предшественником карбонильного углерода ацетоацетата; 3) углерод-1 или углерод-3 (●) кольца является предшественником концевой углеродного атома ацетоацетата; 4) β-углеродный атом фенилаланина (○) становится углеродным атомом 2 ацетоацетата. Имеющиеся данные показывают, что в ходе окисления происходит перемещение боковой цепи.

В печени крысы *n*-оксифенилмолочная кислота, образующаяся из тирозина (рис. 23.7), превращается в результате дегидратации и β-окисления в *n*-оксibenзойную кислоту. Последняя является предшественником убихинона — участника цепи переноса электронов (разд. 12.4) как у крыс, так и у микроорганизмов; одним из промежуточных соединений при этом превращении является 5-деметоксиубихинон-9, другие промежуточные соединения еще не идентифицированы.



Другой метаболический путь превращения тирозина, а именно превращение в окситирамин был описан выше (разд. 22.5.3.2); на этом пути первоначально образуется диоксифенилаланин, который имеет первостепенное значение для синтеза катехоламинов в тканях головного мозга (гл. 37) и мозгового слоя надпочечников (гл. 45).

При врожденном заболевании *алкаптонурии* наблюдается утрата способности к окислению гомогентизиновой кислоты и происходит ее накопление. В печени больных отсутствует гомогентизат-оксидаза, в то же время активность всех других ферментов, катализирующих предыдущие и последующие стадии катаболизма тирозина, не изменяется. Выделение гомогентизиновой кислоты легко обнаружить; при слабом подщелачивании и при контакте с воздухом моча быстро темнеет. Это объясняется легкостью окисления гомогентизиновой кислоты до хинона, который полимеризуется в меланиноподобное вещество. Моча проявляет восстанавливающие свойства; если добавлять к ней разбавленный раствор хлорного железа, то после каждой капли возникает переходящее голубое окрашивание. Капля подщелоченной мочи вызывает быстрое почернение фотобумаги (восстановление окисляющих агентов часто используется для обнаружения в моче глюкозы). При продолжительной алкаптонурии может стать заметной ненормальная пигментация хрящей и других соединительнотканых структур (*охронозис*).

В литературе было только одно сообщение о *тирозинозе*. Метаболический блок был, по-видимому, обусловлен отсутствием *n*-оксифенилпируват-диоксигеназы; у пациента наблюдалась сильно выраженная экскреция *n*-оксифенилпировиноградной кислоты.

23.2.11.1. Тирозин как предшественник меланина

В клетках базального слоя эпидермиса (меланобластах) при участии медьсодержащей *тирозиназы* происходит синтез из тирозина темноокрашенного пигмента меланина. Фермент катализирует окисление тирозина в диоксифенилаланин (ДОФА) и ДОФА-хинон (рис. 23.8). *Галлахром* (получивший такое название, поскольку был выделен из многощетинкового червя, *Halla parthenolapa*) образуется неферментативно в результате дисмутации 2 молекул ДОФА-хинона. Окисление индол-5,6-хинона в меланин является, вероятно, спонтанным. Меланин (*греч. melas* — черный) является полимером или группой полимеров с неупорядоченной структурой. Цвет кожи зависит от распределения меланобластов, количества содержащегося в них меланина и, вероятно, состояния его окисления (меланин может быть восстановлен аскорбиновой кислотой или гидросульфитом, при этом цвет его из черного становится желто-коричневым). Врожденное отсутствие тирозиназы приводит к *альбинизму*.

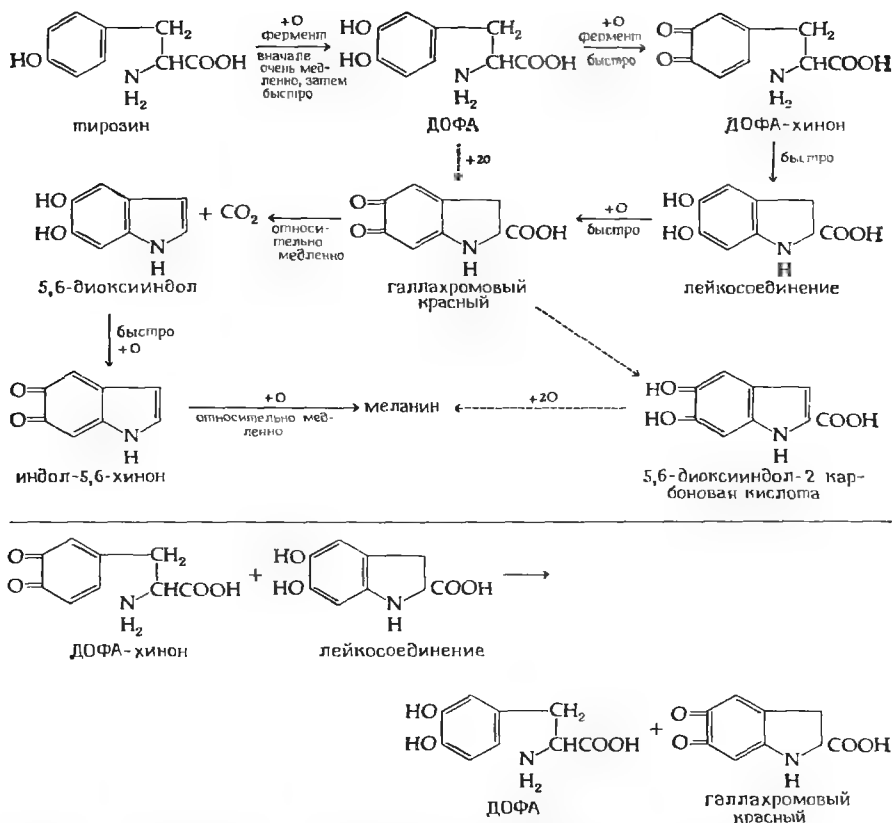


Рис. 23.8. Образование меланина из тирозина [Lerner A. B., Fitzpatrick T. B., *Physiol. Rev.*, 30, 91, 1950].

В норме меланин имеется также в сетчатке, ресничном теле, сосудистой оболочке глаза, в субстанции «нигра» мозга и в мозговом слое надпочечников. Иногда меланобласты являются источником злокачественной опухоли — меланомы, которая часто оказывается пигментированной. Непигментированные меланомные опухоли при «окраске» раствором, содержащим ДОФА, быстро темнеют. Потемнение кожи человека вызывается ультрафиолетовым облучением тирозина, приводящим к образованию ДОФА. У альбиносов отсутствуют либо меланинообразующие клетки, либо тирозиназа, либо оба эти «фактора».

Множественные формы тирозиназы были обнаружены в экстрактах меланом различных млекопитающих (включая человека), а также в коже и волосных луковицах пигментированных мышей

(при этом генетические предпосылки для пигментации могут быть различными). Высокоочищенные препараты фермента были получены из *Neurospora crassa* и грибов.

23.2.12. Лизин

Лизин не участвует в реакциях персаминирования. В печени крыс деградация лизина происходит главным образом в митохондриях; при этом, по-видимому, осуществляются реакции, обратные тем, которые имеют место при синтезе лизина (разд. 20.4.1.9).

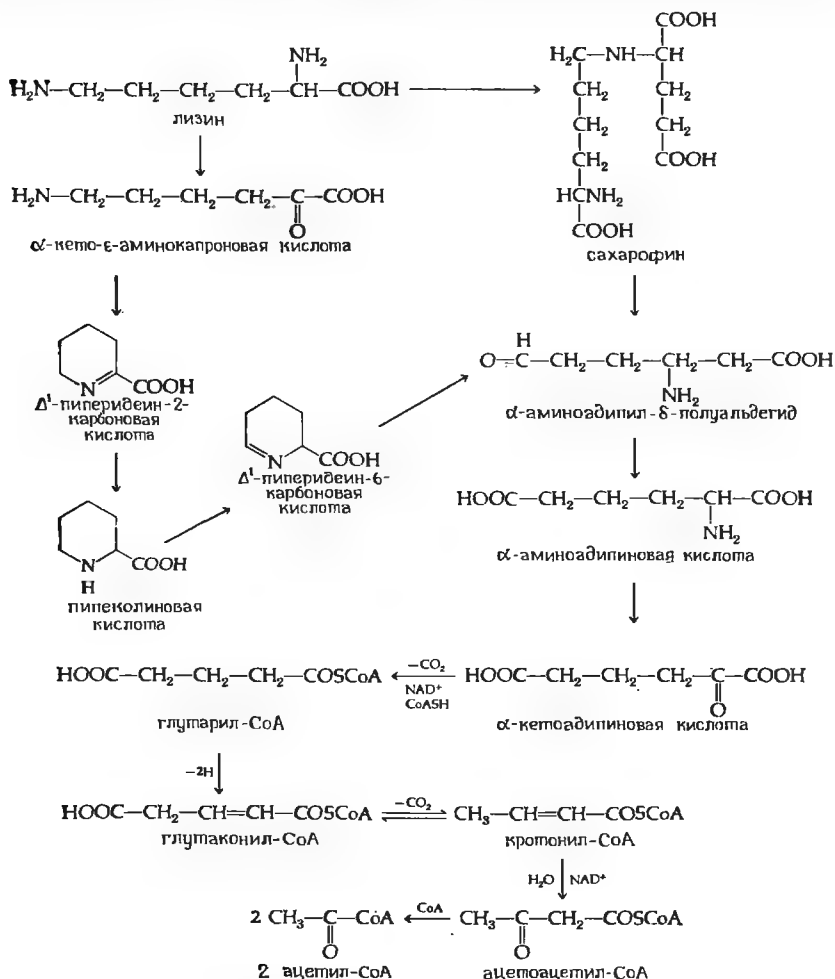


Рис. 23.9. Предполагаемые пути метаболической деградации лизина.

В ходе деградации лизина образуется сахарофин (разд. 20.11), далее открывается прямой путь (обходящий циклические промежуточные соединения) к α -аминоадипил- ϵ -полуальдегиду (рис. 23.9). Этот полуальдегид образуется также и в ходе другого пути деградации лизина (рис. 23.9), начинающегося окислительным дезаминированием, которое катализируется оксидазой L-аминокислот печени. Образующаяся кетокислота спонтанно циклизуется в Δ^1 -пиперидин-2-карбоновую кислоту; восстановление последней ферментом, функционирующим как с NADH, так и с NADPH, приводит к пипеколиновой кислоте. Последняя окисляется в Δ^1 -пиперидин-6-карбоновую кислоту, которая в присутствии АТФ и Mg^{2+} окисляется митохондриями печени до α -аминоадипиновой кислоты (через стадию полуальдегида). Печень содержит пиридиннуклеотидзависимый фермент, катализирующий окисление α -аминоадипил- ϵ -полуальдегида в α -аминоадипиновую кислоту. Последняя путем переаминирования переходит в α -кетoadипиновую кислоту, из которой в результате окислительного декарбоксилирования образуется глутарил-СоА; дальнейшие превращения приведены на рис. 23.9.

Третий путь деградации лизина в тканях млекопитающих, а также у дрожжей протекает через стадии образования ацилированных промежуточных соединений и, таким образом, обходит путь, включающий стадию циклизации кетопроизводного лизина

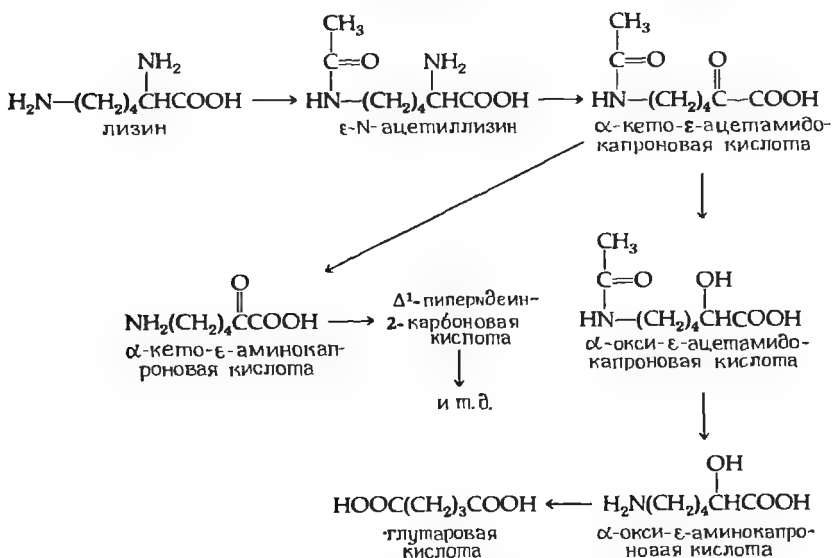


Рис. 23.10. Ацилированные промежуточные соединения, образующиеся в процессе деградации лизина.

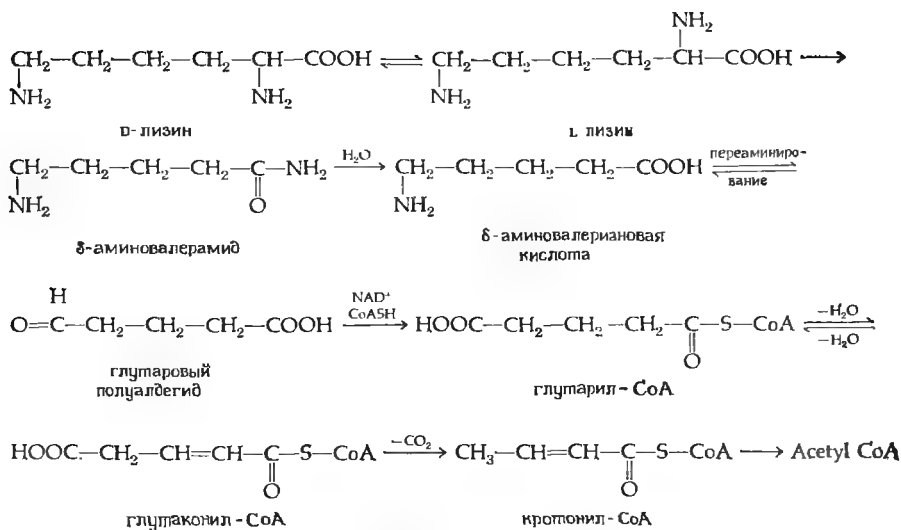
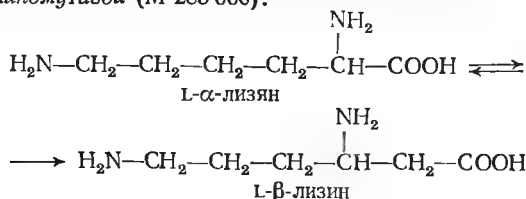


Рис. 23.11. Катаболизм лизина микроорганизмов.

в пипеколиновую кислоту. Фермент печени катализирует образование ϵ -*N*-ацетиллизина. Ацильный остаток сохраняется на стадиях, ведущих к α -окси- ϵ -ацетамидокапроновой кислоте (рис. 23.10), из которой (после деацилирования) образуется глутаровая кислота. Если же деацилирование осуществляется на более ранней стадии, то возникает возможность метаболических превращений по пипеколатному пути (рис. 23.10).

Катаболизм лизина у микроорганизмов протекает через стадии образования промежуточных соединений, показанных на рис. 23.11. Взаимопревращение D- и L-лизина катализируется пиридоксальфосфатзависимой *рацемазой*. При действии *L-лизин-оксигеназы* (*M* 191 000) из L-лизина образуется δ -аминовалерамид. Молекула этой оксигеназы содержит две молекулы FAD и, по-видимому, катализирует окисление, дезаминирование и декарбоксилирование. Образовавшийся амид превращается затем *дезамидазой* в δ -аминовалериановую кислоту. Из последней в результате переаминирования образуется глутаровый полуальдегид; далее через стадии глутарил-CoA, глутаконил-CoA, кротонил-CoA происходит образование ацетил-CoA. Следует отметить, что переаминирование δ -аминовалерата с образованием полуальдегида и последующее окисление до глутарата происходит также у крыс.

Некоторые *Clostridia* сбраживают лизин; при этом первоначально происходит обратимое превращение L-лизина в L- β -лизин, катализируемое пиридоксальфосфатзависимой *аминомутазой* (*M* 285 000):



NH
|
(CH₂=C—CO—).

Активность фермента в печени крысы значительно увеличивается в период, предшествующий половой зрелости, достигая уровня, который сохраняется у взрослого животного. Увеличение активности у молодых животных ускоряется при гипофизэктомии, что указывает на тормозящее влияние гипофизарных гормонов на активность и (или) синтез фермента. У лиц с врожденным заболеванием *гистидинемией* гистидин — аммиак-лиаза отсутствует; это приводит к повышению содержания гистидина в крови и моче.

Уроканатгидратаза катализирует трансформацию урокановой кислоты в имидазолон-3-пропионат. Эта реакция характеризуется вовлечением элементов воды и осуществлением процессов внутримолекулярного окисления и восстановления; ее механизм еще не установлен. Далее имидазолонпропионат-гидролаза осуществляет гидролиз до α-формиминоглутаминовой кислоты. Формиминовая группа может быть перенесена специфической трансферазой в N⁵-положение тетрагидрофолиевой кислоты. N⁵-Формиминотетрагидрофолиевая кислота гидролизуется, циклизуется в N⁵,N¹⁰-метилпроизводное; далее может образоваться N¹⁰-формил- или N⁵,N¹⁰-метилентетрагидрофолиевая кислота (рис. 21.2). Таким образом, атом С-2 имидазольного кольца гистидина возвращается в пул одноуглеродных фрагментов. Животные и люди с недостатком фолиевой кислоты или витамина В₁₂ выделяют большие количества формиминоглутаминовой кислоты; это свидетельствует о том, что главным путем метаболизма формиминогруппы является ее превращение в метильную группу.

Небольшое количество имидазолон-3-пропионата может окисляться до гидантоин-5-пропионата, который не подвергается дальнейшим превращениям, а выделяется с мочой. Пути метаболизма гистидина приведены на рис. 23.12.

У некоторых микроорганизмов формиминоглутаминовая кислота подвергается гидролизу либо до глутамата и формамида под действием *формиминоглутамат-гидролазы*, либо до формилглутамата и NH₄⁺ под действием *N-формил-L-глутамат-иминогидролазы*. Последний фермент (M 100 000) состоит из двух одинаковых субъединиц. Исследования, проведенные на микроорганизмах, позволили выяснить регуляторные механизмы, функционирующие на пути деградации гистидина. У *Klebsiella aerogenes* гистидин — аммиак-лиаза, уроканатгидратаза и формиминоглутамат-гидролаза индуцируются гистидином и урокановой кислотой, а репрессируются глюкозой и глицерином.

Эрготионеин — бетаин 2-меркаптогистидина находится в высокой концентрации в эритроцитах человека (20—30 мг/100 мл цельной крови) и обнаружен также в печени и мозге; его содержание высоко в семенной жидкости кабана. Этот бетаин, возможно, выполняет у млекопитающих определенные метаболические

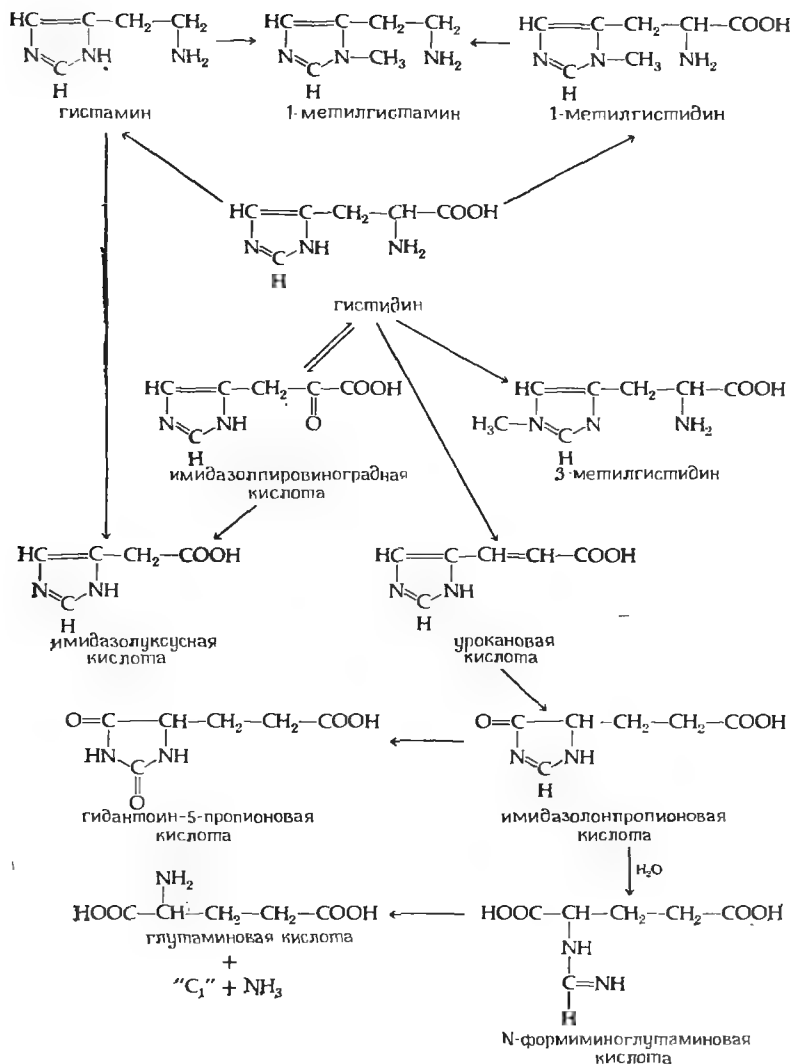


Рис. 23.12. Пути метаболизма гистидина.

функции, однако пока они неизвестны; присутствие этого вещества отражает, по-видимому, его потребление с пищей растительного происхождения. Ничего неизвестно о конечных продуктах метаболизма эрготионеина.

23.2.15. Триптофан

Деградация триптофана у млекопитающих осуществляется в основном по двум путям. На одном из путей происходит окисление триптофана до 5-окситриптофана с последующим декарбоксилированием в 5-окситриптамиин (серотонин). Этот путь, а также путь, ведущий к индолуксусной кислоте, были описаны выше (разд. 22.5.3.3). По другому пути происходит окисление до кинуренина, который превращается далее в ряд промежуточных соединений и побочных продуктов (рис. 23.12); все они (за исключением глутарил-СоА) выделяются с мочой; сумма их примерно соответствует общему количеству метаболизированного триптофана.

Окисление триптофана до *N*-формилкинуренина катализирует *триптофан—2,3-диоксигеназой* (*M* 103 000). Фермент состоит из четырех субъединиц одинаковой молекулярной массы; каждый моль тетрамера содержит 2 г-атома меди и 2 моля гема. Для функционирования фермента необходимы либо ферро-, либо ферригем и Cu^+ . Диоксигеназа широко распространена в природе и получена в высокоочищенном виде из цитозоля печени и из *Pseudomonas*. В печени фермент находится как в форме апофермента, так и в форме холофермента; при этом первая форма является доминирующей. Введение крысам гематина (гл. 32) или предшественника гема δ -аминолевулината (разд. 22.4.1) повышает активность триптофан-диоксигеназы.

Триптофан-диоксигеназа появляется в печени крыс спустя 10 дней после рождения, однако синтез ее может быть индуцирован кортикостероидами в более ранний период (гл. 45). Введение стероидных гормонов или субстрата триптофана в период, когда фермент уже имеется, повышает уровень его активности.

Повышение уровня триптофан-диоксигеназы после введения кортикостероидов является результатом стимулирующего влияния последних на синтез специфической информационной РНК (мРНК), которая кодирует (гл. 26) синтез апофермента диоксигеназы. С другой стороны, повышение уровня активности диоксигеназы после введения триптофана обусловлено не действием его на синтез мРНК (синтез осуществляется нормально), а уменьшением скорости дегградации апофермента и увеличением насыщения фермента субстратом.

При врожденной *болезни Хартнупа* (сопровождающейся задержкой умственного развития) из-за недостаточности триптофан-

диоксигеназы лишь незначительная доля потребляемого триптофана окисляется в формилкинуруенин.

Гидроксилирование кинуруенина катализируется кинуруенин-3-оксигеназой; в реакции участвуют NADPH и O_2 . Фермент специфичен к кинуруенину, и гидроксилирование происходит только в положении 3. 3-Оксикинуруенин (у насекомых он является предшественником зрительных пигментов оммохромов) экскретируется у млекопитающих с мочой в виде либо гликозидуроната, либо О-сульфатного или N- α -ацетильного производного. Пиридоксальфосфатзависимый фермент *кинуруениназа* катализирует расщепление как кинуруенина, так и 3-оксикинуруенина до антраниловой и 3-оксиантраниловой кислот соответственно; в обоих случаях другим продуктом реакции является аланин. 3-Оксикинуруенин расщепляется примерно в два раза быстрее, чем кинуруенин. Последний вступает также в реакцию переаминирования; из кетокислоты в результате замыкания кольца образуется кинуруениновая кислота. Дегидроксилирование кинуруениновой кислоты приводит к хиналидиновой кислоте. В виде хиналидиновой кислоты у человека экскретируется около 30% принятой с пищей кинуруениновой кислоты.

Окисление 3-оксиантраниловой кислоты катализируется митохондриальным ферментом *3-оксиантранилат-оксигеназой* (M 34 000), находящейся в печени и почках. Для функционирования фермента необходимы Fe^{2+} и сульфгидрильное соединение; в образующийся α -амино- β -карбоксимуконил- δ -полуальдегид включается O_2 . Апофермент (не содержащий железа) может быть реактивирован добавлением Fe^{2+} ; удаление железа блокируется при добавлении субстрата. Сульфгидрильные соединения (цистеин или восстановленный глутатион) вызывают в ферменте конформационные изменения, приводящие к его активации. После стадии образования α -амино- β -карбоксимуконил- δ -полуальдегида происходит разветвление путей деградации триптофана: он может превращаться либо в хинолиновую и никотиновую кислоты, либо в глутаровую кислоту и далее в ацетил-CoA. Может происходить также декарбоксилирование полуальдегида; последующая циклизация продукта приводит к образованию пиколиновой кислоты. Рассмотренные превращения приведены на рис. 23.13.

Образование никотиновой кислоты из хинолиновой кислоты происходит в результате реакции, катализируемой *хинолинат-трансфосфорибозилазой*; хинолиновая кислота взаимодействует с 5-фосфорибозил-1-пирофосфатом; при этом выделяется CO_2 и образуется рибонуклестид никотиновой кислоты. Последний непосредственно используется для синтеза NAD (разд. 24.1.9).

В условиях дефицита пиридоксина как крысы, так и человек выделяют ненормально большие количества кинуруенина и ксантуреновой кислоты. Последняя экскретируется также в большом

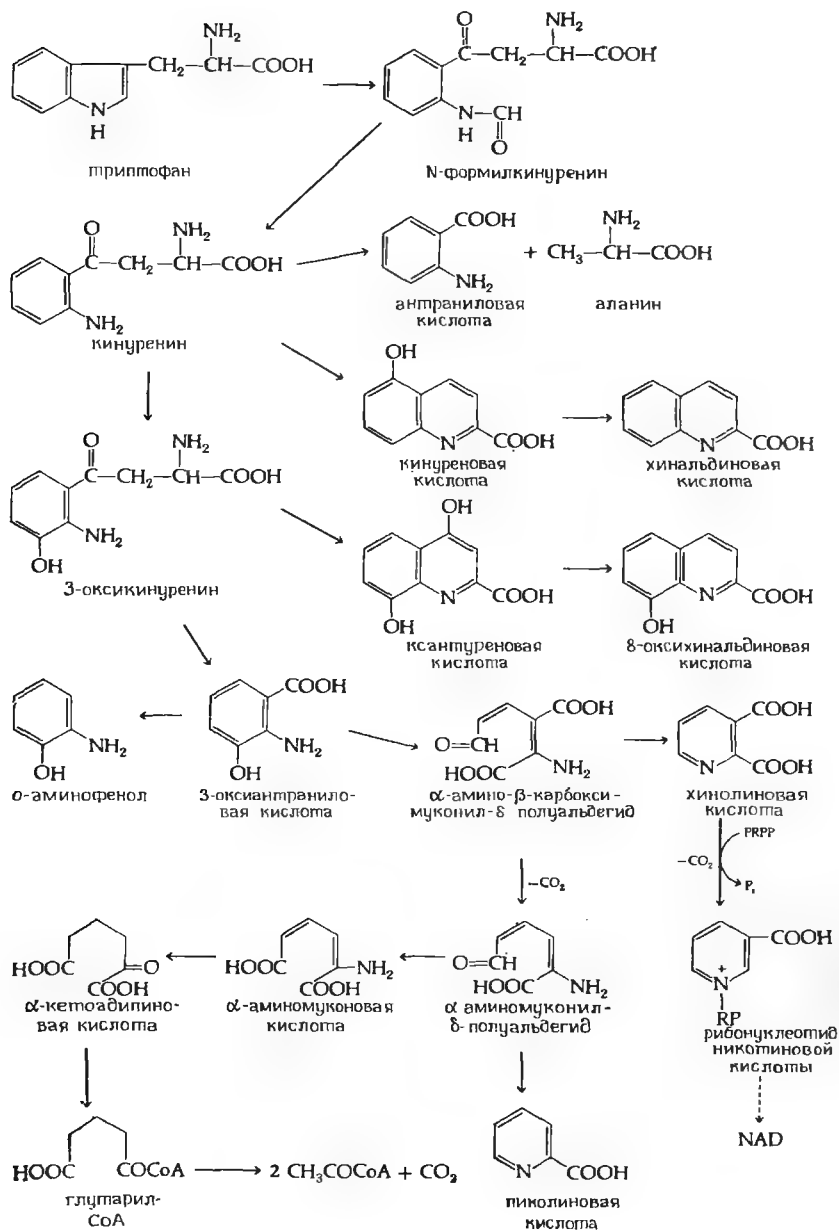
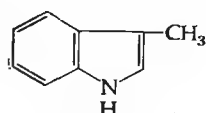


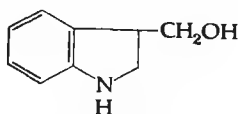
Рис. 23.13. Метаболические взаимоотношения между триптофаном и его метаболитами. PRPP — 5-фосфорибозил-1-пирофосфат; RP — рибозо-5-фосфат.

количестве при беременности; это может быть связано с повышением содержания в крови эстрогенных и прогестиновых гормонов, поскольку, как сообщалось, эстрогены тормозят *in vitro* превращение кинуренина в кинуреновую кислоту. При утрате одной гидроксидной группы ксантуреновая кислота превращается в 8-оксихинальдиновую кислоту.

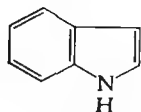
Индолуксусная кислота (разд. 22.5.3.3) экскретируется с мочой у млекопитающих в виде индолацетуровой кислоты, образующейся в результате конъюгации индолуксусной кислоты с глицином. Вероятным предшественником индолуксусной кислоты является триптами, который, как известно, образуется в толстом кишечнике из триптофана в результате декарбоксилирования последнего бактериальными ферментами. Экскреция с мочой индолуксусной и индолмолочной кислот увеличена у больных фенилкетонурией (разд. 21.4.2.4). Микроорганизмы толстого кишечника могут осуществлять дальнейшую деградацию индолуксусной кислоты с образованием скатола, скатосила, индола и индоксила.



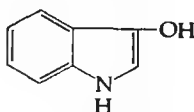
скатол



скатоксил



индол

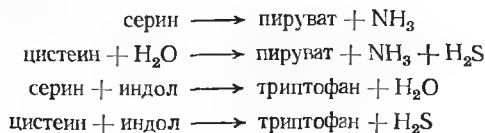


индоксил

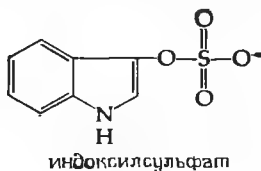
Кристаллический гемопротеид ($M \approx 250\,000$), выделенный из *Pseudomonas*, катализирует окисление триптофана по углеродному атому, соседнему с индольным кольцом. Субстратами этого фермента являются также различные замещенные по 3-положению производные индола, в том числе некоторые триптофансодержащие олигопептиды. Продуктами реакции являются α,β -дидегидротриптофан и H_2O ; это позволяет предполагать, что в ходе реакции в качестве промежуточного соединения образуется β -оксипроизводное. Этот фермент, который был предварительно назван « α,β -оксидаза боковой цепи триптофана», атакует только соединения с интактным индольным кольцом.

Индол может образовываться также непосредственно из триптофана в результате действия бактериального фермента *триптофаназы*; этот фермент катализирует расщепление боковой цепи триптофана с образованием индола, аммиака и пировиноградной кислоты.

Промежуточным соединением в ходе этой реакции является связанная с ферментом α -аминоакриловая кислота; в качестве кофермента функционирует пиридоксальфосфат. Кристаллическая триптофаназа из *E. coli* (M 220 000) состоит из четырех идентичных субъединиц; помимо рассмотренного выше расщепления она катализирует также ряд реакций α , β -элиминирования и β -замещения, включая следующие:



Неприятный запах содержимого толстого кишечника обусловлен частично скатолом и индолом. Небольшие количества индоксила и скатоксила поступают из кишечника в кровь; в печени происходит конъюгирование их либо с сульфатом, либо с глюкуроновой кислотой, образующиеся эфиры сульфатов или глюкозидуронаты экскретируются с мочой. Калиевая соль индоксилсульфата известна под названием *индикан*; уровень концентрации в моче индоксилсульфата рассматривают как качественный показатель степени активности бактерий в толстом кишечнике.



ЛИТЕРАТУРА

Книги

- Arias I., Jakoby W. B., eds., Workshop on Glutathione, Krok Foundation Conference, Raven Press, Publishers, New York, 1976.
 Bender D. A., Amino Acid Metabolism, Wiley-Interscience, New York, 1975.
 Bianchi R., Mariani G., McFarlane A. S., eds., Plasma Protein Turnover, University Park Press, Baltimore, 1976.
 Greenberg D. M., ed., Metabolic Pathways, vol. III, Academic Press, Inc., New York, 1969.
 Greenberg D. M., ed., Metabolic Pathways, vol. VII, 3rd ed., Metabolism of Sulfur Compounds, Academic Press, Inc., New York, 1975.
 Hardy R. W. F., ed., Dinitrogen Fixation, Wiley-Interscience, New York, 1975.
 Meister A., Biochemistry of the Amino Acids, 2d ed., vols. I and II, Academic Press, Inc., New York, 1965.
 Munro H. N., Allison J. B., eds., Mammalian Protein Metabolism, vols. I and II, Academic Press, Inc., New York, 1964.

- Russell D. H.*, Polyamines in Normal and Neoplastic Growth, Raven Press, Publishers, New York, 1973.
- Schimke R. T., Katunuma N.*, eds., Intracellular Protein Turnover, Academic Press, Inc., New York, 1975.
- Shapiro S. K., Schlenk F.*, eds., Transmethylation and Methionine Biosynthesis, The University of Chicago Press, Chicago, 1965.
- Snell E. E., Fasella P. M., Braunstein A., Rossi Fanelli A.*, Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis, Pergamon Press, New York, 1963.
- Stanbury J. B., Wyngarden J. B., Fredrickson D. S.*, eds., The Metabolic Basis of Inherited Disease, 3d ed., McGraw-Hill Book Company, New York, 1972.
- Tabor H., Tabor C. W.*, eds., Metabolism of Amino Acids and Amines, vols. XVIIA and B, in S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds., Methods in Enzymology, Academic Press, Inc., New York, 1970, 1971.
- Vogel H. J.*, ed., Metabolic Pathways, vol. V, Academic Press, Inc., New York, 1971.

Обзорные статьи

- Braustein A. E.*, Amino Group Transfer, pp. 379—481, in: P. D. Boyer, ed., The Enzymes, vol. 9, 3rd ed., Academic Press, Inc., New York, 1973.
- Cantoni G. L.*, Biological Methylation: Selected Aspects, Annu. Rev. Biochem., **44**, 435—451, 1975.
- Christensen H. N., DeCespedes C., Handlogten M. E., Ronquist G.*, Energization of Amino Acid Transport, Studied for the Ehrlich Ascites Tumor Cell, Biochem. Biophys. Acta, **300**, 487—522, 1973.
- Cooper A. J. L., Meister A.*, The Glutamine Transaminase- ω -amidase Pathway, Crit. Rev. Biochem., **4**, 281—303, 1977.
- Dalton H., Mortenson L. E.*, Dinitrogen (N_2) Fixation (with a Biochemical Emphasis), Bacteriol. Rev., **36**, 231—260, 1972.
- Eady R. R., Postgate J. R.*, Nitrogenase, Nature, **249**, 805—810, 1974.
- Felig P.*, Amino Acid Metabolism in Man, Annu. Rev. Biochem., **44**, 933—955, 1975.
- Gibson F., Pittard J.*, Pathways of Biosynthesis of Aromatic Amino Acids and Vitamins and Their Control in Microorganisms, Bacteriol. Rev., **32**, 465—492, 1968.
- Guirard B. M., Snell E. E.*, Vitamin B_6 Function in Transamination and Decarboxylation Reactions, chap. 5, in: M. Florkin and E. H. Stotz, eds., Comprehensive Biochemistry, vol. 14, American Elsevier Publishing Company, Inc., New York, 1964.
- Jacobson G. R., Stark G. R.*, Aspartate Transcarbamylases, in: P. D. Boyer, ed., The nEnzymes, vol. 9, pp. 225—308, Academic Press, Inc., New York, 1973.
- Jordan P. M., Shemin D.*, δ -Aminolevulinic Acid Synthetase, pp. 339—356, in: P. D. Boyer, ed., The Enzymes, vol. 7, 3rd ed., 1972.
- Knox W. E.*, Sir Archibald Garrod's Inborn Errors of Metabolism, I: Cystinuria, Am. J. Human Genet., **10**, 3—32, 1958.
- Knox W. E.*, Sir Archibald Garrod's Inborn Errors of Metabolism, II: Alkaptonuria, Am. J. Human Genet., **10**, 95—124, 1958.
- Lipmann F.*, Attempts to Map a Process Evolution of Peptide Biosynthesis, Science, **173**, 875—884, 1971.
- Lombardini J. B., Talalay P.*, Formation, Functions and Regulatory Importance of S-Adenosyl-L-Methionine, Adv. Enzyme Regul., **9**, 349—384, 1971.
- Meister A.*, On the Enzymology of Amino Acid Transport, Science, **180**, 33—39, 1973.
- Meister A.*, Asparagine Synthesis, pp. 561—580, in: P. D. Boyer, ed., The Enzymes, vol. 10, 3rd ed., Academic Press, New York, 1974.
- Meister A.*, Glutathione Synthesis, pp. 671—697, in: P. D. Boyer, ed., The Enzymes, vol. 10, 3rd ed., Academic Press, New York, 1974.
- Meister A.*, Glutamine Synthetase of Mammals pp. 699—754 in: P. D. Boyer, ed., The Enzymes, vol. 10, 3rd ed., Academic Press, Inc., New York, 1974.

- Meister A., Tate S. S.*, Glutathione and Related γ -Glutamyl Compounds: Biosynthesis and Utilization, *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 559—604, 1976.
- Peck H. D., Jr.*, Sulfation Linked to ATP Cleavage, pp. 651—699, in: P. D. Boyer, ed., *The Enzymes*, vol. 10, 3rd ed., Academic Press, Inc., New York, 1974.
- Rader J. T., Huennekens F. M.*, Folate Coenzyme-mediated Transfer of One-Carbon Groups, pp. 197—223, in: P. D. Boyer, ed., *The Enzymes*, vol. 9, 3rd ed., Academic Press, Inc., New York, 1973.
- Ratner S.*, Enzymes of Arginine and Urea Synthesis, *Adv. Enzymol.*, **39**, 1—90, 1973.
- Sanwal B. D., Kappor M., Duckworth H. W.*, The Regulation of Branched and Converging Pathways, *Curr. Top. Cell. Regul.*, **3**, 1—115, 1971.
- Schimke R. T.*, On the Roles of Synthesis and Degradation in Regulation of Enzyme Levels in Mammalian Tissues, *Curr. Top. Cell. Regul.*, **1**, 77—124, 1969.
- Shemin D.*, δ -Aminolevulinic Acid Dehydratase, pp. 323—337, in: P. D. Boyer, ed., *The Enzymes*, vol. 7, 3rd ed., 1972.
- Snell E. E.*, Pyruvate-containing Enzymes, *Trends Biochem. Sci.*, **2**, 131—135, 1977.
- Stadtman E. R., Ginsburg A.*, The Glutamine Synthetase of *Escherichia coli*: Structure and Control, pp. 755—807, in: P. D. Boyer, ed., *The Enzymes*, vol. 10, 3rd ed., Academic Press, Inc., New York, 1974.
- Tabor C. W., Tabor H.*, 1,4-Diaminobutane (Putrescine), Spermidine, and Spermine, *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 285—306, 1976.
- Taylor R. T., Weissbach H.*, N^5 -Methyltetrahydrofolate-Homocysteine Methyltransferases, pp. 121—165, in: P. D. Boyer, ed., *The Enzymes*, vol. 9, 3rd ed., Academic Press, Inc., New York, 1973.
- Truffa-Bachi P., Cohen G. N.*, Amino Acid Metabolism, *Annu. Rev. Biochem.*, **42**, 113—134, 1973.
- Umbarger H. E.*, Regulation of the Biosynthesis of the Branched-Chain Amino Acids, *Curr. Top. Cell. Regul.*, **1**, 57—76, 1969.
- Williams-Ashman H. G.*, Control Mechanism in the Biosynthesis of Aliphatic Amines, pp. 245—269, in: E. Kun and S. Grisolia, eds., *Biochemical Regulatory Mechanisms in Eukaryotic Cells*, Interscience Publisher, division of John Wiley and Sons, Inc., New York, 1972.
- Williams-Ashman H. G., Janne J., Coppoc G. L., Geroch M. E., Schenone A.*, New Aspects of Polyamine Biosynthesis in Eukaryotic Organisms, *Adv. Enzyme Regul.*, **10**, 225—245, 1972.
- Winter H. C., Burris R. H.*, Nitrogenase, *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 409—426, 1976.

Глава 24

МЕТАБОЛИЗМ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Химия пуринов и пиримидинов описана в гл. 7, а роль различных нуклеотидов была обсуждена в предыдущих главах. Эта глава посвящена возникновению и метаболическому пути каждого нуклеотида и его составляющих. Биосинтезу нуклеиновых кислот и их участию в синтезе белка посвящены следующие главы.

Так как пуриновые и пиримидиновые компоненты нуклеиновых кислот могут синтезироваться *in vivo*, то их наличие в пище животных необязательно. В 1874 г. Мишер обнаружил, что, хотя лосось ничего не ест во время длительного пути к верховьям рек для икрометания, его гонады увеличиваются за счет мышечного белка. Гипертрофия гонад обусловлена синтезом большого количества нуклеиновых кислот. Однако для нормального роста и развития многих видов микроорганизмов необходимо наличие в питательной среде определенных пуринов или пиримидинов.

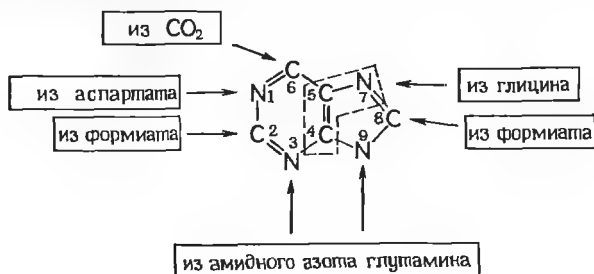
Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды могут быть синтезированы *de novo* из ненуклеотидных предшественников (аминокислот CO_2 и NH_3) либо *обходными путями*, либо непосредственно из готовых пуриновых и пиримидиновых оснований. Относительное значение этих двух путей может сильно различаться для разных клеток.

24.1. Синтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов

24.1.1. Пути синтеза *de novo* пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов

Основные предшественники пуринового ядра были установлены с помощью изотопно меченных соединений. Эти соединения добавляли в корм голубей, у которых отработанный азот экскретируется в виде мочевой кислоты. Химическое разрушение экстре-

тированной мочевой кислоты приводит к следующей общей схеме образования пуринового ядра:

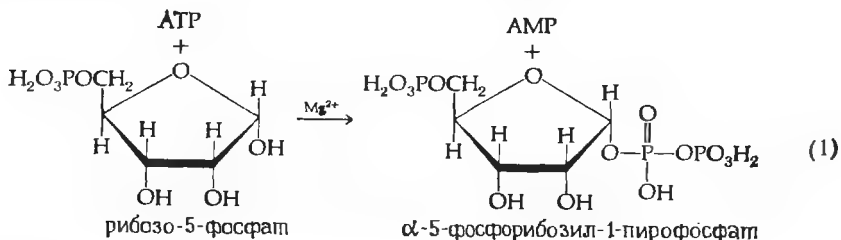


Атомы углерода в положениях 2 и 8 образуются из формата или другого одноуглеродного фрагмента, возникающего из различных соединений, например серина и глицина (разд. 18.1.2). Атом С-6 возникает из CO₂. Глицин дает атомы С-4 и С-5 и атом N-7; атом N-1 появляется из аспарагиновой кислоты, а амидная группа глутаминна поставляет атомы N-3 и N-9.

Общий путь биосинтеза пуринов *de novo* существенно одинаков для многих исследованных видов (млекопитающих, птиц, дрожжей и бактерий). В сущности этот процесс состоит из серии последовательных реакций, с помощью которых у первого углеродного атома рибозо-5'-фосфата формируется пуриновое ядро, в результате чего непосредственно образуются пуриновые нуклеотиды. Ни свободные пурины, ни нуклеозиды не образуются в качестве промежуточных продуктов этой цепи превращений.

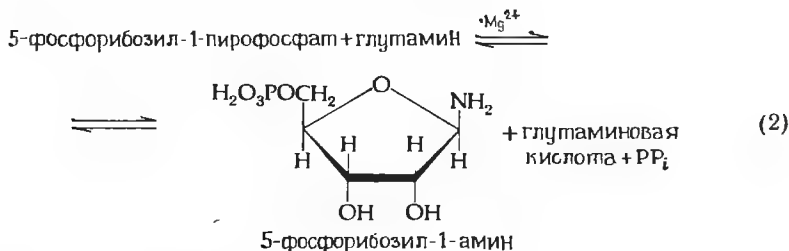
24.1.1.1. 5-Фосфорибозил-1-пирофосфат (PRPP)

Это соединение необходимо для биосинтеза как пуриновых, так и пиримидиновых нуклеотидов. Оно образуется из рибозо-5-фосфата и АТР путем необычной реакции, которая катализируется *рибозо-5-фосфат—пирофосфокиназой*, переносящей не фосфатный, а пирофосфатный остаток. Фермент из печени млекопитающих сильно ингибируется избытком АТР, АДФ и других ди- и трифосфатов, но для его работы абсолютно необходим неорганический ортофосфат P_i:



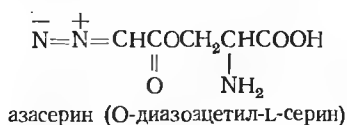
24.1.1.2. 5-Фосфорибозил-1-амин

Лабильный гликозиламин — 5-фосфорибозил-1-амин — образуется из глутамина и PRPP в присутствии *глутамин-фосфорибозил-пирофосфат-амидотрансферазы*. Этот фермент из печени голубя (M 200 000) состоит из двух одинаковых субъединиц (M 100 000) и содержит от 10 до 12 атомов железа.

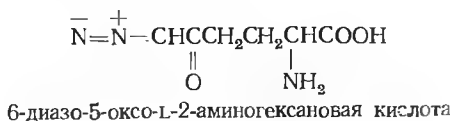


Фосфорибозилпирофосфат имеет α -конфигурацию гликозидного центра, а пуриновые нуклеотиды и 5-фосфорибозил-1-амин — β -конфигурацию. В реакции (2) замещение пирофосфатной группы на аминную сопровождается инверсией конфигурации при C-1. Эта реакция является «ключевой» стадией биосинтеза пуринов и ингибируется пуриновыми нуклеотидами.

Азасерин (О-дiazоацетил-Л-серин), антибиотик, выделенный из *Streptomyces*, ингибирует использование глутамина для образования 5-фосфорибозил-1-аминa.

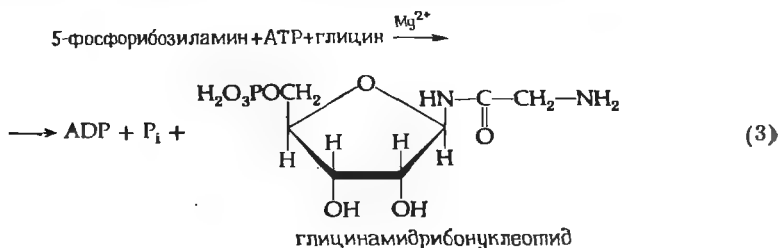


Азасерин ингибирует рост некоторых неоплазм благодаря способности препятствовать синтезу пуриновых нуклеотидов. Азасерин ингибирует также использование глутамина и в другой приведенной ниже реакции (5). Как азасерин, так и 6-дiazо-5-оксо-Л-2-аминогексановая кислота ингибируют все известные ферментативные реакции, при которых амидный атом N глутамина переносится на другую углеродную цепь.



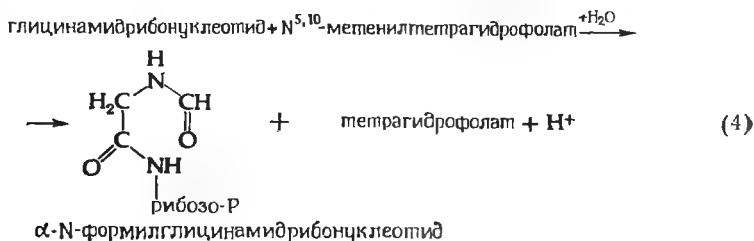
24.1.1.3. Глицинамидрибонуклеотид

В следующей реакции, катализируемой *фосфорибозил-глицинамидсинтетазой*, карбоксил глицина связывается с аминогруппой 5-фосфорибозил-1-амина. Реакция легко обратима.



24.1.1.4. Формилглицинамидрибонуклеотид

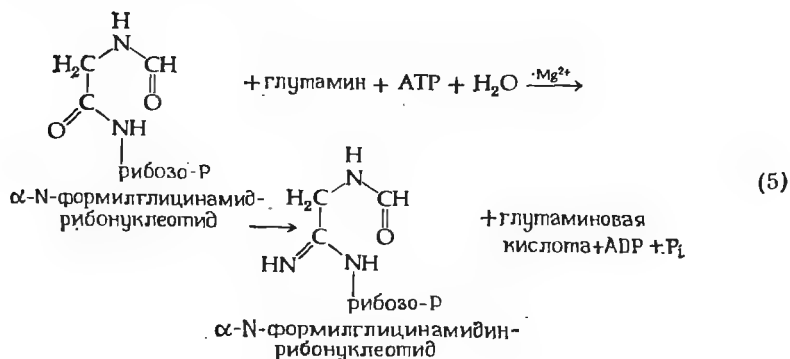
Формилирование глицинамидрибонуклеотида происходит в результате практически необратимой реакции переноса с использованием формильного производного фолиевой кислоты. Реакция катализируется *глицинамид-рибонуклеотид-трансформилазой*. Рибозо-Р в нижеприведенной и последующих реакциях обозначает рибозо-5-фосфатную часть соединений.



24.1.1.5. Формилглицинамидирибонуклеотид

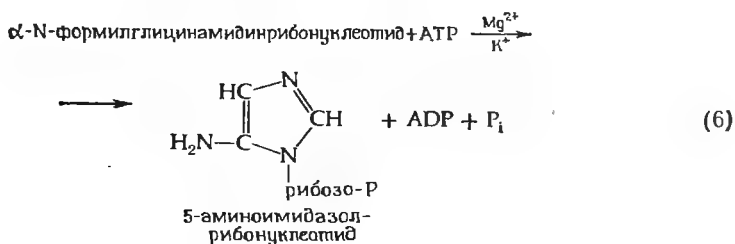
Следующая стадия заключается в переносе амидной группы глутамина на α-N-формилглицинамидрибонуклеотид. Реакция (5) похожа на реакцию (2) (в которой также используется глутамин) тем, что обе реакции необратимы и сильно ингибируются азасе-рином и 6-диазо-5-оксо-L-2-аминогексановой кислотой. При дейст-

вин на *амидолигазу*, которая катализирует реакцию (5), азасерин ацилирует важную тиольную группу цистеинового остатка с образованием тioenфира. После кислотного гидролиза был выделен S-карбоксиметилцистеин.



24.1.1.6. 5-Аминоимидазолрибонуклеотид

Замыкание первого цикла приводит к имидазольному производному

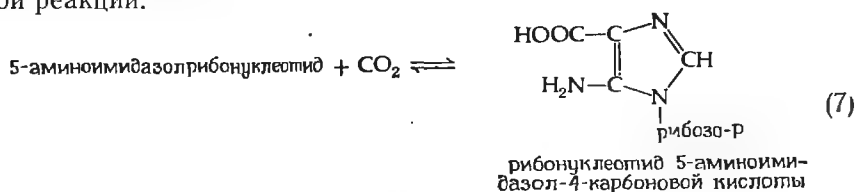


Аминоимидазолсинтетаза, катализирующая эту практически необратимую реакцию циклизации, нуждается в Mg^{+2} и K^+ .

24.1.1.7. Рибонуклеотид 5-аминоимидазол-4-карбоновой кислоты

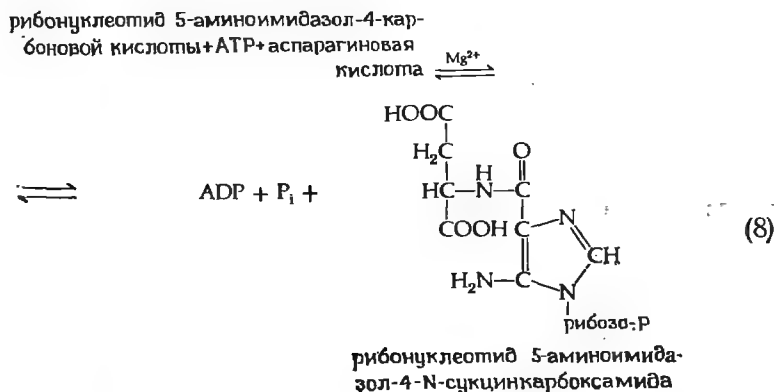
Равновесие реакции, катализируемой *карбоксилиазой*, неблагоприятно для карбоксилирования, поэтому для того, чтобы достичь значительной степени превращения в карбоксипроизводное, необходима высокая концентрация бикарбоната. Однако *in vivo* эта реакция идет при физиологической концентрации бикарбоната благодаря непрерывному удалению продукта реакции последую-

щей стадии. Биотин не принимает участия в фиксации CO_2 при этой реакции.



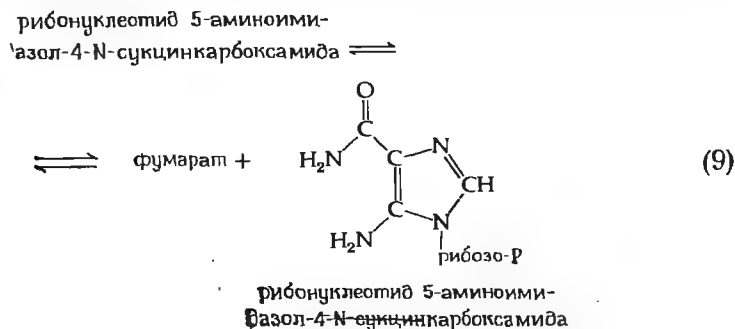
24.1.1.8. Рибонуклеотид 5-аминоимидазол-4-N-сукцинкарбоксамида

Образование этого амида с помощью специфической синтетазы легко обратимо.



24.1.1.9. Рибонуклеотид 5-аминоимидазол-4-карбоксамида

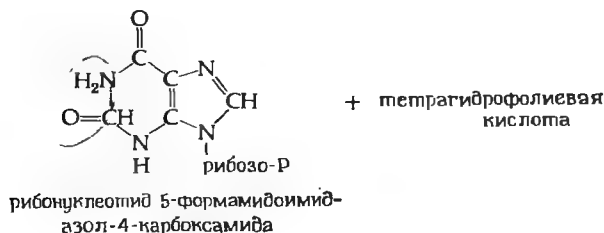
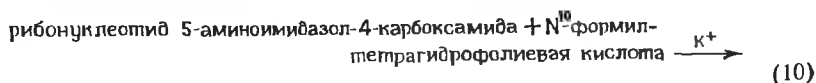
Предполагается, что фермент, катализирующий это негидролитическое расщепление, идентичен аденилосукуциназе (разд. 24.1.2).



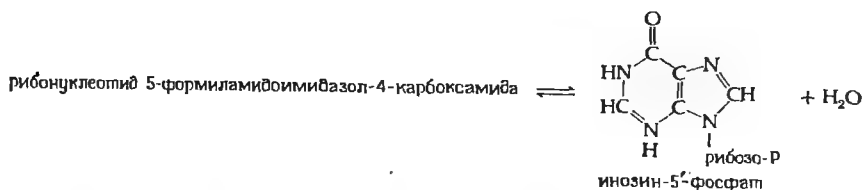
Аминоимидазолкарбоксамид был впервые выделен из культур *E. coli*, ингибированных сульфонидами, и позднее из культур мутантов других микроорганизмов, неспособных к образованию пуринов. Затем из культур *E. coli*, ингибированных сульфонидами, были выделены соответствующие нуклеозид и рибонуклеотид. Действие сульфонидами, препятствующее размножению бактерий, обусловлено ингибированием синтеза фолиевой кислоты (разд. 8.6.). Так как формильное производное фолиевой кислоты (разд. 21.4.2.8) необходимо для формилирования рибонуклеотида 5-аминоимидазолкарбоксамид (см. выше), то этим можно объяснить накопление рибонуклеотида аминоимидазолкарбоксамид в присутствии сульфонидами. Нет сомнений, что образование карбоксамид и соответствующего нуклеозида обусловлено гидролизом рибонуклеотида.

24.1.1.10. Рибонуклеотид 5-формиламидоимидазол-4-карбоксамид

Трансформилаза, которая катализирует эту реакцию, и инозиниказа, которая катализирует следующий этап, ассоциированы в виде одной белковой молекулы. Однако трансформилаза нуждается в K^+ , а инозиниказа нет.

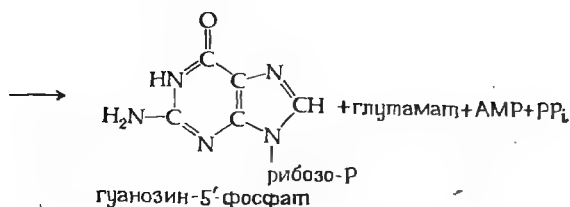


Инозин-5'-фосфат. Замыкание цикла с помощью инозиниказы приводит к инозин-5'-фосфату (IMP) — первому продукту синтетического пути, содержащему завершённое пуриновое ядро.



24.1.2. Взаимные превращения пуриновых нуклеотидов

Адениловая кислота образуется из инозиновой через аденилосукцинат при участии аспарагиновой кислоты и гуанозинтрифос-

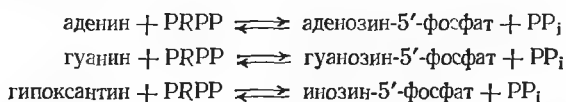


Как и другие реакции, идущие с участием глутамина (разд. 24.1.1.2), образование гуаниловой кислоты необратимо и ингибируется азасерином и 6-диазо-5-оксо-L-2-аминогексановой кислотой.

24.1.3. Запасные пути синтеза пуриновых нуклеотидов

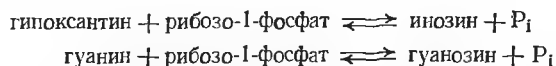
Как описано выше, адениловая и гуаниловая кислоты образуются через инозиновую кислоту. Однако пуриновые нуклеотиды могут образовываться также из свободных пуринов и пуриновых нуклеозидов. Эти пути можно считать запасными, которые позволяют реутилизировать пурины и пуриновые производные, образующиеся при распаде нуклеиновых кислот или нуклеотидов.

Свободные пурины могут непосредственно реагировать с PRPP, образуя нуклеозид-5'-монофосфаты. Приведенные ниже обратимые реакции катализируются двумя различными ферментами печени *аденин-фосфорибозилтрансферазой* и *гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазой*:

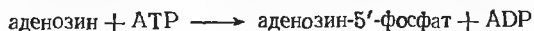


Так как освобождающийся при этих реакциях пирофосфат (PP_i) может легко гидролизироваться *неорганической пирофосфатазой*, синтез пуриновых нуклеотидов протекает необратимо.

Другие запасные пути включают превращение свободных пуринов в нуклеозиды и нуклеозидов в нуклеотиды. Так, известны реакции образования пуриновых нуклеозидов, катализируемые *пури-нуклеозидфосфорилазой*:



Превращение нуклеозида в нуклеотид идет следующим образом:

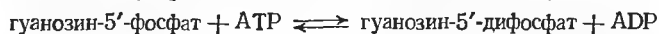
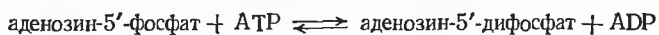


и катализируется, например, *аденозинкиназой*.

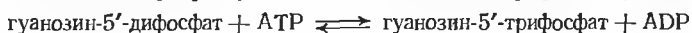
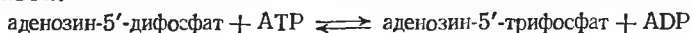
Таким образом, пуриновые нуклеотиды в тканях млекопитающих образуются двумя путями. Первый путь *de novo* заключается в синтезе из простейших ациклических предшественников. Второй путь служит для реутилизации пуринов и нуклеозидов, возникающих в кишечном тракте или в результате процессов внутриклеточной деградации. Реутилизация осуществляется превращением этих соединений в нуклеотиды. Этот путь играет определенную роль в регуляции пуринового метаболизма (см. ниже).

24.1.3.1. Превращение пуриновых нуклеозидмонофосфатов в трифосфаты

Превращение пуриновых нуклеозидмонофосфатов в трифосфаты катализируется специфическими киназами:



Эти реакции стимулируются регенерацией АТФ и дальнейшим фосфорилированием дифосфатов неспецифической *нуклеозиддифосфаткиназой*:



24.1.4. Регуляция синтеза пуриновых нуклеотидов

Как было отмечено (разд. 24.1), ключевой стадией биосинтеза пуринов является образование 5-фосфорибозиламина. Катализирующий эту реакцию фермент *глутамин-фосфорибозилпрофосфат — амидотрансфераза* ингибируется моно-, ди- и трифосфатами гуанозина и аденозина, что замедляет соответствующие реакции основного пути биосинтеза. Так как смесь адениновых и гуаниновых производных ингибирует гораздо сильнее, чем отдельные соединения, то было предположено, что у фермента имеются отдельные участки связывания для адениновых и гуаниновых ингибиторов.

ИМР является предшественником как для АМР, так и для ГМР (разд. 24.1.2). ГМР ингибирует образование ХМР, а АМР ингибирует синтез аденилосукцината из ИМР. В результате, этот механизм обратной связи предотвращает дальнейшее образование АМР или ГМР, когда какой-либо из них присутствует в избыточном количестве, в синтезе *de novo* или по запасному пути. Некоторые регуляторные стадии синтеза пуриновых нуклеотидов показаны на рис. 24.1. Следует, однако, отметить, что сведения об этих ферментах получены главным образом при использовании печени голубя и *E. coli*, а механизмы контроля изучались практически только на бактериальных ферментах. Контрольные механизмы действуют также и в тканях млекопитающих, но детали еще не выяснены.

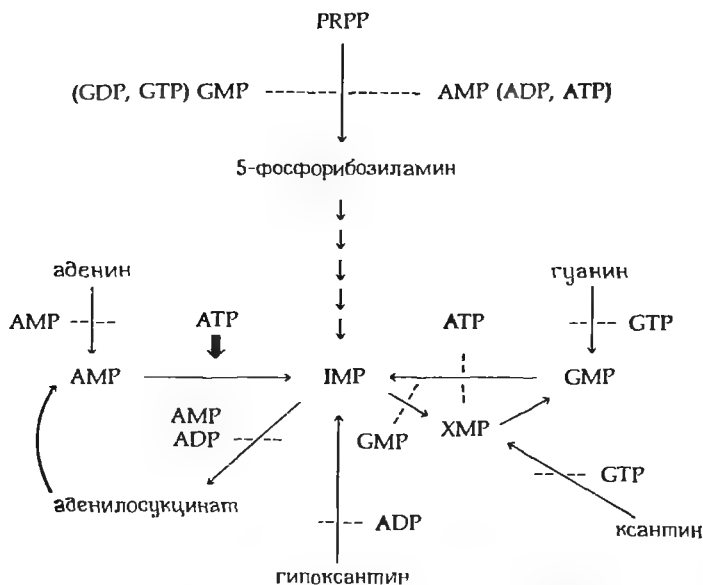
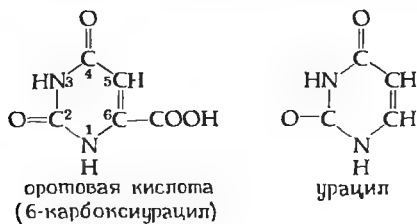


Рис. 24.1. Взаимосвязь и некоторые контрольные механизмы путей биосинтеза пуриновых нуклеотидов. Жирной стрелкой обозначена активация, штриховой линией — ингибирование.

24.1.5. Пути синтеза *de novo* пиримидиновых нуклеотидов

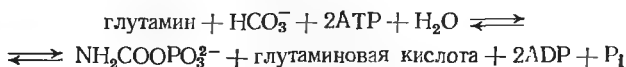
Сведения о предшественниках биосинтеза пиримидинов были сначала получены при исследованиях на микроорганизмах. Оротовая кислота (6-карбоксиурацил), обнаруженная впервые в коровьем молоке, полностью обеспечивала рост тех мутантов *Neurospora*, которые не были способны синтезировать пиримидины. Структура оротовой кислоты и урацила (для сравнения) приведена ниже.



24.1.5.1. Карбамоилфосфат

Путь, ведущий к образованию оротовой кислоты и пиримидиновых нуклеотидов *de novo*, начинается с синтеза карбамоилфос-

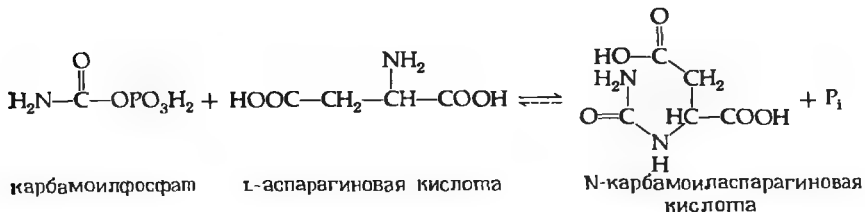
фата. Как было отмечено, существуют две различные *карбамоил-фосфатсинтетазы* (CPSазы) в тканях млекопитающих — одна из них связана с образованием цитруллина при биосинтезе аргинина и присутствует преимущественно в печени (разд. 21.4.3.4) и использует NH_3 в качестве субстрата; вторая присутствует во всех тканях животных и способна участвовать в синтезе пириимидиновых нуклеотидов, утилизирует глутамин, и является регуляторным участком для биосинтеза пириимидиновых нуклеотидов в животных тканях.



Как и следовало ожидать, CPSазы ингибируются аналогами глутамина — азасерином и 6-диазо-5-оксо-L-аминогексановой кислотой.

24.1.5.2. Карбамоиласпарагиновая кислота

Аспартат-транскарбамоилаза (АТСаза) катализирует вторую стадию синтеза *de novo* пириимидиновых нуклеотидов, синтез карбамоиласпарагиновой кислоты.

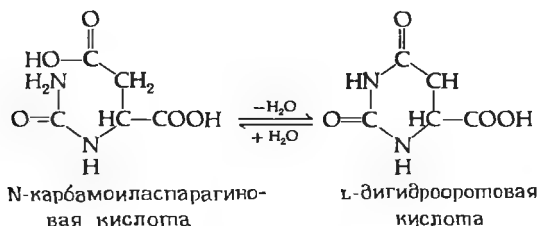


Равновесие этой реакции сильно смещено в сторону образования карбамоиласпарагиновой кислоты. Эта стадия является ключевой в биосинтезе пириимидиновых нуклеотидов у *E. coli* и является объектом ингибирования конечным продуктом биосинтеза пириимидинов — цитидинтрифосфатом; механизм подобной регуляции обсуждался ранее (разд. 8.7.1). На активность АТСаз из различных животных тканей не влияют на цитидинтрифосфат, ни другие пириимидиновые нуклеозидфосфаты, и эти ферменты не являются регуляторными участками на пути биосинтеза пириимидиновых нуклеотидов.

24.1.5.3. Дигидрооротовая кислота

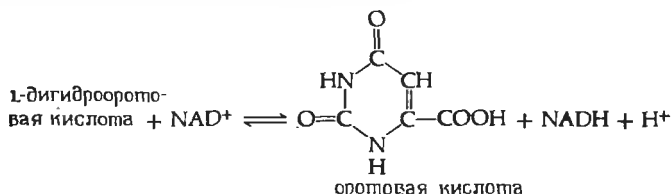
Замыкание цикла катализируется *дигидрооротазой* и приводит к L-дигидрооротовой кислоте. В состоянии равновесия соотношение

урендопроизводного к дигидрооротовой кислоте равно 2 : 1.



24.1.5.4. Оротовая кислота

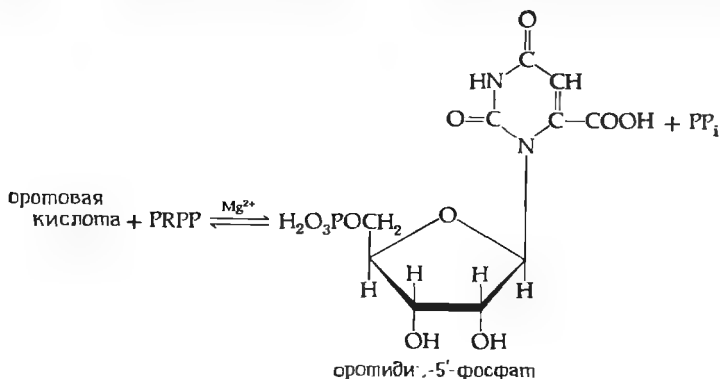
Дигидрооротовая кислота окисляется до оротовой с помощью *дигидрооротат-дегидрогеназы*; слабо охарактеризованный митохондриальный фермент содержит Fe^{2+} и Zn^{2+} и *in vivo* может восстанавливать цитохром *b* (разд. 13.2.2).



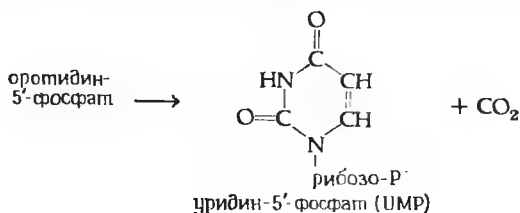
В животных клетках первые три фермента, участвующие в синтезе оротовой кислоты (CPSаза, АТСаза и дигидрооротаза), входят в состав единой полипептидной цепи (M 210 000) аналогично синтетазе жирных кислот (гл. 17).

24.1.5.5. Образование монофосфатов пиримидинуклеозидов

Нуклеотиды образуются в результате реакции оротовой кислоты с PRPP, катализируемой *оротат-фосфорибозилтрансферазой*.

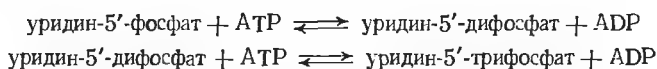


При декарбоксилировании оротидин-5'-фосфата при помощи *оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазы* образуется уридин-5'-фосфат.

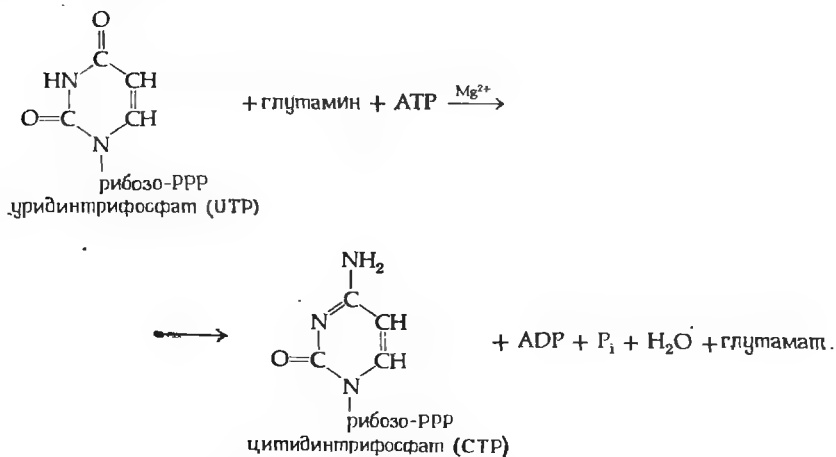


24.1.5.6. Превращение монофосфатов пиримидиннуклеозидов в трифосфаты

Уридин-5'-фосфат превращается в уридин-5'-дифосфат с помощью специфической *уридилаткиназы* и затем в соответствующий трифосфат с помощью *нуклеозид-дифосфат — киназы*.



Для образования цитидинтрифосфата известен единственный путь — аминирование уридинтрифосфата. Рибозо-PPP обозначает рибозо-5'-трифосфат



Стехиометрическое отщепление одного моля P_i от АТР свидетельствует о том, что в ходе реакции образуется фосфорилированный промежуточный продукт. Гуаниновые нуклеотиды стимулируют эту реакцию.

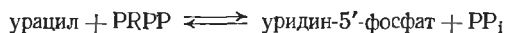
Цитидинтрифосфат может также образовываться из цитидин-5'-монофосфата путем последовательного переноса фосфатного остатка с АТР и промежуточного образования цитидин-5'-дифосфата. Эти реакции катализируются специфической *цитидилаткиназой* и *нуклеозид-дифосфат—киназой*.

Наследственное нарушение метаболизма пиримидинов у человека, известное как *оротовая ацидурия*, характеризуется накоплением оротовой кислоты и ее выделением с мочой. Дети с таким расстройством не растут нормально и страдают мегалобластической анемией. В этом случае сильно понижена активность как фосфорибозилтрансферазы, так и декарбоксилазы, необходимых для образования UMP. Прием уридина или цитидина восстанавливает нормальный рост, прекращает анемию и уменьшает выделение оротовой кислоты. Все это свидетельствует о том, что это заболевание является следствием дефекта механизма генетического контроля.

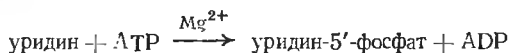
Следует отметить, что при синтезе пуринов *de novo* все промежуточные продукты являются производными рибозо-5-фосфата. При биосинтезе пиримидинов пиримидиновое кольцо образуется до конденсации с рибозофосфатом. Хотя пурины содержат пиримидиновый цикл, сконденсированный с имидазольным, но предшественники этих двух гетероциклических систем различны. Следует также отметить, что первичные нуклеотиды в обоих случаях — инозиновая и оротидиловая кислоты — не являются основными компонентами нуклеиновых кислот.

24.1.6. Запасные пути синтеза пиримидиновых нуклеотидов

Аналогично пуриновым нуклеотидам пиримидиновые нуклеотиды также могут образовываться из свободных пиримидинов или нуклеозидов по запасным метаболическим путям. Урацил (и 5-фторурацил) могут быть превращены в UMP и 5-F-UMP прямой реакцией с PRPP, катализируемой урацил-фосфорибозилтрансферазой, которая имеется в клетках как животных, так и микробов. Цитозин не является субстратом для этого фермента

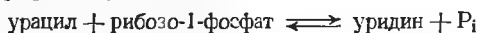


UMP может образовываться также из уридина с помощью *уридин-цитидинкиназы*



В этой реакции субстратами могут служить уридин, цитидин и соответствующие фторпроизводные, но не оротидин. Наконец, уридин может синтезироваться из урацила с помощью реакции, катализи-

руемой *уридинфосфорилазой*, которая в обратном направлении приводит к фосфоролизу уридина.



Фосфоролитическое расщепление цитидина неизвестно; однако после дезаминирования *цитидиндезаминазой* образовавшийся уридин является субстратом для фосфорилазы. Аналогичный фермент, *тимидинфосфорилаза*, будет рассмотрен ниже.

24.1.7. Образование дезоксирибонуклеотидов

Пуриновые и пиримидиновые дезоксирибонуклеотиды образуются в результате восстановления рибозного остатка соответствующего рибонуклеотида. Впервые заключение о прямом восстановлении рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов было сделано на основе исследований, в которых цитидин, ^{14}C -меченный как по ядру, так и по сахарному остатку, вводили крысам. Было обнаружено, что удельная радиоактивность цитозина и дезоксирибозы в ДНК такая же, что и в инъецированном цитидине. Это свидетельствует о том, что превращение рибозы в дезоксирибозу идет без расщепления связи рибозы с пиримидином.

Механизм этого превращения был выяснен сначала при изучении восстановления рибонуклеотидов в экстрактах *E. coli*. Один фермент — *рибонуклеозид-дифосфат-редуктаза* — катализирует восстановление всех четырех рибонуклеозиддифосфатов ADP, GDP, CDP и UDP в их дезоксипроизводные dADP, dGDP, dCDP и dUDP соответственно. Этот фермент (M 245 000) состоит из двух субъединиц: B1 (M 160 000) и B2 (M 78 000). Субъединица B2 состоит из двух идентичных полипептидных цепей и содержит негемное железо; B1 состоит из двух неидентичных полипептидов. Механизм восстановления включает атаку гидрид-ионом H^- по атому C-2' рибозного остатка, что приводит к замещению гидроксильной группы у C-2 на атом водорода без изменения конфигурации.

Источник восстанавливающей способности рибонуклеозид-редуктазы *in vivo* неизвестен. Однако было показано, что *in vitro* активны два донора водорода. Одним является маленький серосодержащий белок *тиоредоксин* (разд. 20.4.1.1) (M 12 000), две сульфгидридные группы которого окисляются с образованием дисульфидного мостика. Тиоредоксин может быть возвращен в восстановленную форму с помощью NADPH и *тиоредоксинредуктазы*, которая представляет собой флавопротеид, содержащий два моля флавинадениндинуклеотида на моль фермента (M 68 000). Вторым донором водорода является восстановленный глутатион, который работает в присутствии нового белка — *глутаредоксина*. Окисленный глутатион может быть возвращен в активное восстановлен-

ное состояние с помощью глутатионредуктазы, сопряженной с NADPH (разд. 13.2).

Активность рибонуклеозид-дифосфат-редуктазы аллостерически регулируется нуклеозидтрифосфатами, одни из них работают как стимуляторы, другие — как ингибиторы. Так, восстановление CDP и UDP сильно стимулируется ATP (рис. 24.2), а восстановление ADP и GDP стимулируют dGTP и dTTP. dATP ингибирует восстановление всех четырех рибонуклеозиддифосфатов.

Общая система эффикторов и ингибиторов делает возможным сбалансированное поступление восстановленных дифосфатов и, следовательно, трифосфатов, непосредственных предшественников синтеза ДНК (гл. 25).

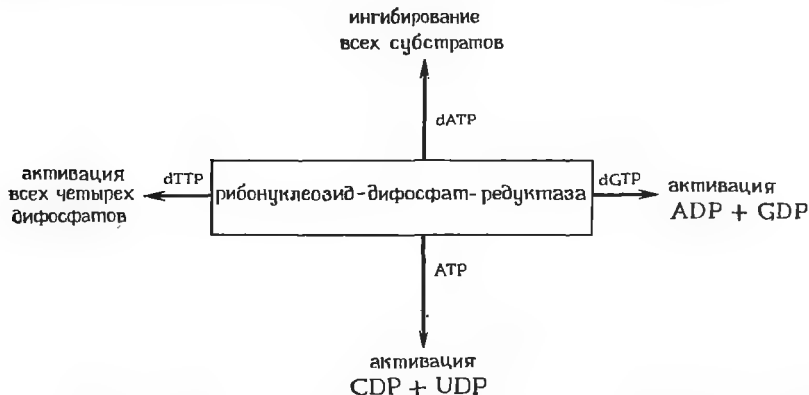


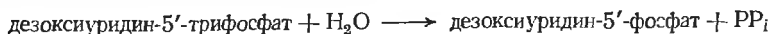
Рис. 24.2. Схематическое изображение аллостерического влияния нуклеозидтрифосфатов на рибонуклеозиддифосфатредуктазу *E. coli* [Larsson A., Reichard P., J. Biol. Chem., 241, 2540, 1966].

Редуктазные системы, выделенные из различных животных клеток, имеют такие же свойства, что и описанная выше система из *E. coli*.

Другая система была обнаружена у различных видов *Lactobacillus* и *Euglena*. Перечислим основные характеристики последних систем. 1) Предпочтительными субстратами служат рибонуклеозидтрифосфаты, ATP, GTP, CTP и UTP, восстановление которых катализируется одним ферментом. 2) Дигидролипид может служить донором водорода, хотя настоящий восстановитель до сих пор не идентифицирован. 3) 5,6-Диметилбензимидазолкобаламинный кофермент (кофермент витамина B₁₂, гл. 50) является необходимым компонентом системы. 4) Mg²⁺ и ATP (dATP) стимулируют восстановление CTP и ингибируют восстановление UTP и GTP. 5) Различные дезоксирибонуклеозидтрифосфаты работают как эффикторы, стимуляторы и ингибиторы: их действие лишь в деталях отличается от действия на систему из *E. coli*.

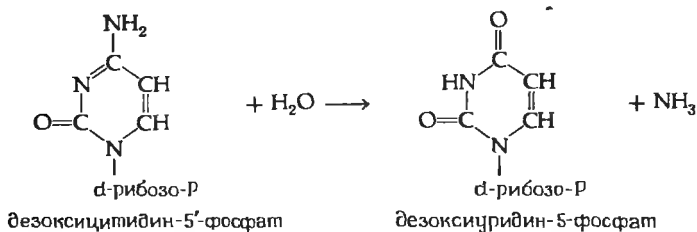
24.1.7.1. Образование тимидиновых нуклеотидов

dUMP, непосредственный предшественник dTMP, образуется при гидролизе UTP, катализируемом *дезоксисуридинтрифосфатдифосфогидролазой* (dUTPазой).



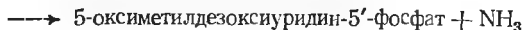
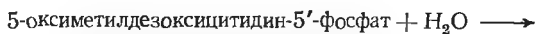
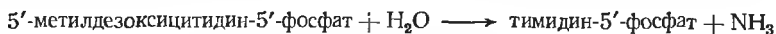
Эта реакция служит также для предотвращения включения урацила в ДНК (гл. 25).

Деаминирование dCMP *дезоксцитидилатгидролазой* также приводит к образованию dUMP. В приведенных ниже формулах



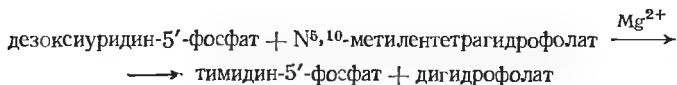
d-рибозо-P отражает дезоксирибозо-5'-фосфат.

Этот фермент, присутствующий в печени, также катализирует деаминирование метил- и оксиметилдезоксцитидиловых кислот.



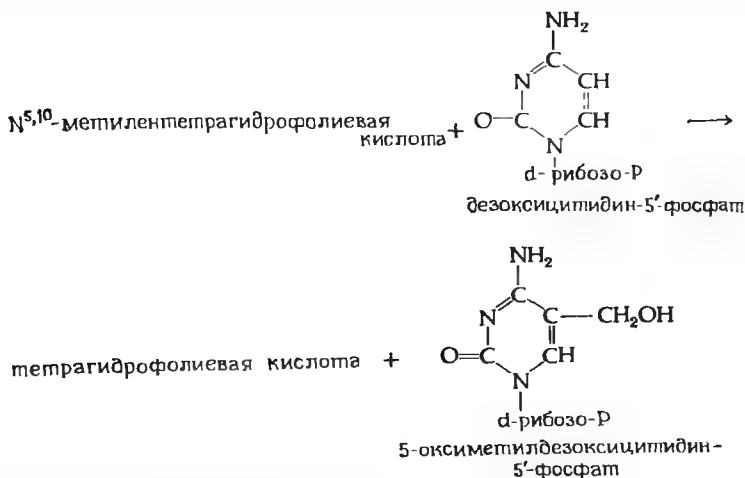
В присутствии Ca^{2+} , Mg^{2+} или Mn^{2+} dCTP является аллостерическим активатором этого фермента, а dTTP — ингибитором.

Метилирование dUMP катализируется *тимидилатсинтетазой*.

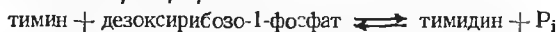


Тетрагидрофолат служит как источником углерода, так и непосредственным донором водорода в этой сложной реакции. Образуемый дигидрофолат восстанавливается до тетрагидрофолата в сопряженной с NADP реакции, катализируемой *дигидрофолатредуктазой*.

Аналогичная реакция, но без восстановления идет при образовании 5-оксиметилдезоксцитидин-5'-фосфата из CMP при инфицировании *E. coli* бактериофагами T2, T4 или T6 (гл. 28).



dTMP может также образовываться по запасному пути из тимина при участии *тимидинфосфорилазы* и *тимидинкиназы*.



Уровень *тимидинкиназы* резко возрастает при инфицировании клеток некоторыми вирусами или в условиях повышенной скорости роста, например при регенерации печени. Этот фермент регулируется аллостерически — ингибируется dTTP и стимулируется различными дезоксирибонуклеозиддифосфатами.

Образование дезоксирибонуклеозидди- и трифосфатов из монофосфатов идет при помощи специфических дезоксирибонуклеотидкиназ и неспецифических нуклеозиддифосфаткиназ, как описано для рибонуклеотидов (разд. 24.1.3). Общая схема основных взаимопревращений пиримидиновых дезоксирибонуклеотидов приведена на рис. 24.3.

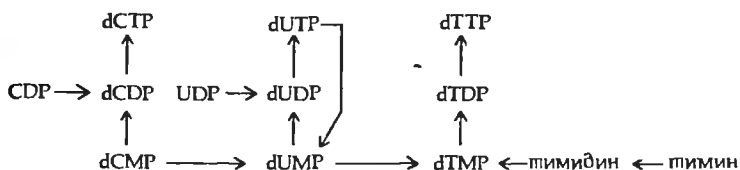


Рис. 24.3. Общая схема основных взаимопревращений пиримидиновых дезоксирибонуклеотидов.

24.1.8. Регуляция синтеза нуклеотидов

Из вышесказанного ясно, что отдельные регуляторные механизмы осуществляют контроль за образованием пуриновых нуклеотидов (разд. 24.1.4), пиримидиновых нуклеотидов (24.1.5) и дезоксирибонуклеотидов (разд. 24.1.7). Рибонуклеозидтрифосфаты используются при образовании всех типов РНК (гл. 26), а дезоксинуклеозидтрифосфаты являются непосредственными предшественниками биосинтеза ДНК (гл. 25). То, что свободные дезоксирибонуклеозидтрифосфаты присутствуют в клетках в очень малой концентрации, свидетельствует о том, что синтез дезоксинуклеотидов является скоростью лимитирующей стадией при синтезе ДНК. Таким образом, сбалансированный рост и размножение клеток нуждаются в синтезе большого количества нуклеозидтрифосфатов, которые должны поступать в нужном соотношении. Непосредственным источником энергии при образовании всех этих соединений является АТФ; регулирование образования АТФ зависит от энергетических потребностей клетки и находится под контролем различных механизмов. Однако доступность АТФ однозначно определяет скорость образования всех рибо- и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, так как 5-фосфорибозил-1-пирофосфат является исходным веществом при образовании всех нуклеотидов и большие количества АТФ необходимы для образования этого ключевого соединения. Фермент, катализирующий синтез 5-фосфорибозил-1-пирофосфата, сильно ингибируется ADP и GDP, что ограничивает синтез этого ключевого соединения при уменьшении энергоснабжения клетки. Влияние ADP как отрицательного эффектора гораздо сильнее, чем GDP. Триптофан и гистидин оказывают слабое влияние, хотя PRPP является предшественником синтеза этих аминокислот (гл. 21).

24.1.9. Образование нуклеотидных коферментов

Все рибонуклеотиды, обнаруженные в РНК, играют и другую важную роль в метаболизме. Так, были обнаружены реакции, в которых участвуют адениловая, гуаниловая, уридиловая, цитидиловая и тимидиловая кислоты и соответствующие ди- и трифосфаты. Биосинтез и роль этих соединений были рассмотрены ранее. Также было обращено внимание на нуклеотиды, содержащие остатки, не обнаруженные в нуклеиновых кислотах, — никотинамид, флаavin и пантотеновую кислоту. Биосинтез нуклеотидов, содержащих эти остатки, нуждается, как правило, в АТФ.

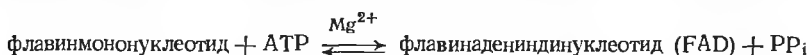
24.1.9.1. Флавиновые нуклеотиды

Рибофлаavin — 7,8-диметил-10-(1'-D-рибитил)изоаллоксазин — (гл. 50) является необходимым компонентом пищи млекопитающих.

ших. Как уже обсуждалось, он функционирует в виде моно- или динуклеотида в качестве простетической группы ряда ферментов. *Флавиномононуклеотид* (рибофлавин-5'-фосфат) образуется из рибофлавина и АТФ в ходе реакции, катализируемой флавокиназой



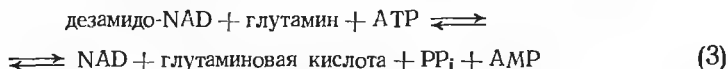
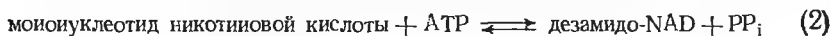
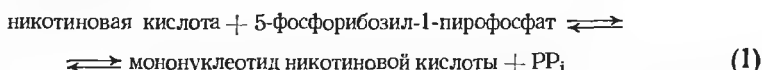
Флавинадениндинуклеотид образуется из мононуклеотида с помощью обратимой реакции, катализируемой *флавииннуклеотидфосфо-рилазой*



24.1.9.2. Пиридиннуклеотиды

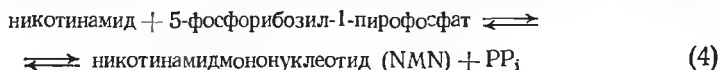
Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) (разд. 12.1.1) содержит никотинамид, важный компонент пищи млекопитающих (гл. 50). Путь образования *de novo* никотиновой кислоты из триптофана (рис. 23.13) приводит непосредственно к мононуклеотиду никотиновой кислоты.

В эритроцитах человека, дрожжах и свиной печени ниацин (никотиновая кислота) реагирует с PRPP, образуя мононуклеотид никотиновой кислоты, который далее конденсируется с АТФ, что приводит к дезамидо-NAD. Последний превращается в NAD при реакции с глутамином и АТФ.



NAD-Синтетаза катализирует реакцию (3) и ингибируется азасе-рином.

Эритроциты и, вероятно, другие клетки могут синтезировать никотинамидмононуклеотид из никотинамида следующим образом:



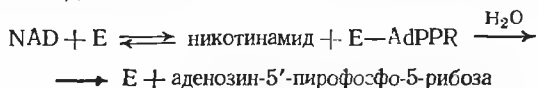
Реакция (2) катализируется *NAD-пирофосфорилазой*, которая может также катализировать реакцию



Соответствующий фермент локализован в ядре клеток млекопитающих и может играть важную регуляторную роль в клеточном

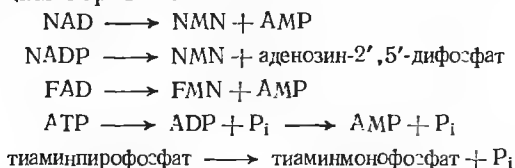
цикле, будучи важным участником общего синтеза пиридиновых нуклеотидов. Безъядерные зрелые эритроциты содержат только следы этого фермента.

В растительных и животных клетках не были обнаружены ферменты, способные катализировать прямой синтез никотинамида из никотиновой кислоты. Однако никотинамид может образоваться из никотиновой кислоты по реакциям (1) — (3) с последующим действием *никотинамид-динуклеотид-глицогидролазы* (NADазы), которая гидролизует NAD по N-гликозидной связи между рибозой и никотинамидом.



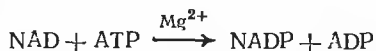
Аденозиндифосфорибоза гидролизруется до адениловой кислоты и рибозо-5-фосфата, которые затем следуют по метаболическим путям, обычным для этих соединений.

Нуклеотидфосфорилаза гидролизует различные пирофосфатные связи следующим образом:



Физиологическая роль этого фермента неизвестна, но он широко использовался для выяснения структуры ряда коферментов, содержащих пирофосфатную группу, например никотинамиддинуклеотидфосфата NADP и CoA.

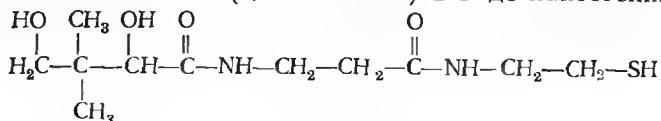
NADP образуется из NAD по следующей реакции, катализируемой NADкиназой:



24.1.9.3. Кофермент А

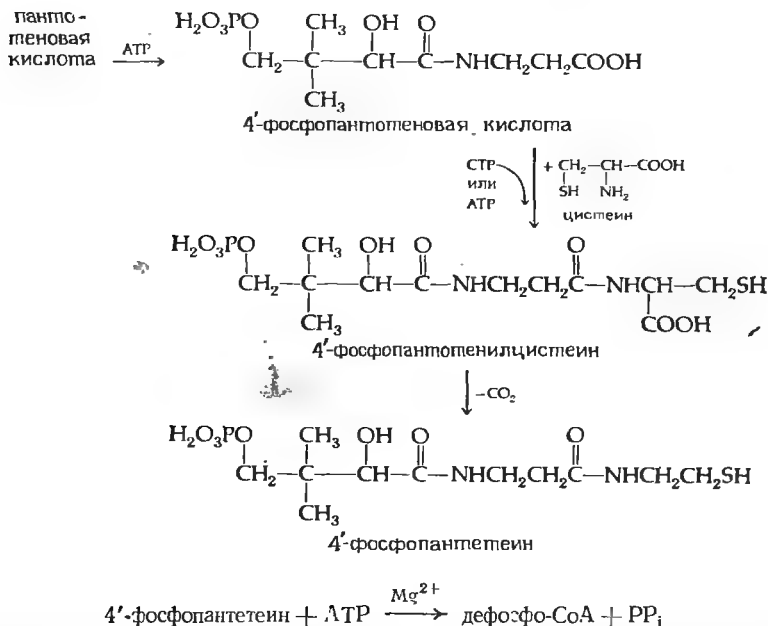
Полная структура кофермента А приведена в разд. 12.2.1. Пантотеновая часть молекулы (пантоил-β-аланин) является необходимым компонентом диеты млекопитающих; синтез ее в микроорганизмах описан в гл. 50.

Пантотеновая кислота существует в природе в комбинации с β-меркаптоэтиламиноом (цистеамином) в виде пантетеина.

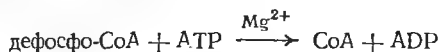


пантетеин

Пантетеин является промежуточным продуктом при образовании CoA в печени млекопитающих и в некоторых микроорганизмах, как показано ниже:



3'-Фосфатная группа аденозинового остатка CoA отсутствует в дефосфо-CoA; последний превращается в CoA с помощью специфической дефосфо-CoA — киназы.



24.1.9.4. Ингибиторы синтеза нуклеотидов

Так как быстро делящиеся клетки, например раковые клетки и микроорганизмы, нуждаются в большом количестве нуклеотидов для образования нуклеиновых кислот, а зрелые клетки растут медленно, рост раковых клеток и бактерий можно ингибировать, блокируя синтез нуклеотидов. Как уже было отмечено (разд. 8.6), *сульфонамиды* блокируют образование фолиевой кислоты в организме и, следовательно, влияют на этот процесс. Так как фолиевая кислота необходима для формилирования на двух стадиях биосинтеза пуринов и при синтезе тимидилата, образование нуклеиновых кислот и различных нуклеотидных коферментов также прекращается. Аналогичным образом подавляется синтез пурино-

вых нуклеотидов и, следовательно, нуклеиновых кислот при действии азасерина (разд. 24.1.1.2) и подобных ему соединений, которые блокируют перенос амидной группы с глутамина, что является необходимой стадией при синтезе пуриновых нуклеотидов.

Антагонисты фолиевой кислоты, например *аминоптерин* и *аметоптерин* (*метатрексат*), которые ингибируют рост опухолей и бактерий, блокируют восстановление дигидрофолатата до тетрагидрофолатата специфической редуктазой (разд. 21.4.2.8). Это тоже предотвращает формилирование на двух этапах синтеза пуриновых нуклеотидов и образование тимидилата. Ингибирование бактериального роста этими аналогами фолиевой кислоты можно преодолеть добавлением аденина и тимина.

Пуриновый аналог *6-меркаптопурин* превращается в рибонуклеотид и является мощным ингибитором PRPP-трансферазы и превращения инозиновой кислоты в адениловую и ксантиловую кислоты (последняя является предшественником гуаниловой кислоты, разд. 24.1.2). Это приводит к предотвращению синтеза нуклеиновых кислот.

Некоторые галогенпиримидины, например 5-фтордезоксипуридин, блокируют синтез ДНК, ингибируя тимидилатсинтетазу. Другие галогенпроизводные пиримидинов и пуринов действуют как мутагены (гл. 26).

24.2. Распад пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов

24.2.1. Расщепление нуклеиновых кислот

Кроме образования нуклеотидов с помощью биосинтеза, как было обсуждено выше, эти соединения являются компонентами нуклеиновых кислот, входящих в состав пищи. В отличие от белков, переваривание которых начинается в желудке, нуклеиновые кислоты не затрагиваются желудочными ферментами и их расщепление начинается в двенадцатиперстной кишке. Поджелудочная железа продуцирует *нуклеазы*, которые секретируются в панкреатический сок. Панкреатическая *рибонуклеаза* гидролизует только РНК, освобождая пиримидиновые мононуклеотиды и олигонуклеотиды, имеющие на 3'-конце пиримидиновые нуклеотиды с фосфатной группой у 3'-гидроксидной группы. *Дезоксирибонуклеаза* работает в присутствии Mg^{2+} или Mn^{2+} и специфически гидролизует ДНК до олигонуклеотидов (гл. 7). Предполагается, что в слизистой оболочке кишечника образуются диэстеразы, которые гидролизуют олигонуклеотиды до мононуклеотидов.

В отличие от высокого уровня зимогенов протеолитических ферментов в панкреатической жидкости всех позвоночных содержится весьма различающееся количество панкреатической рибо-

нуклеазы. Панкреас копытных, в частности жвачных, грызунов и травоядных сумчатых содержит много этого фермента, в то время как у большинства других позвоночных, включая человека, этот фермент содержится в небольших количествах. Высокий уровень концентрации этого фермента у некоторых видов приписывают необходимости утилизации больших количеств фосфора и азота бактериальной РНК травоядными, особенно жвачными.

24.2.1.1. Распад мононуклеотидов

Освобожденные нуклеотиды гидролизуются кишечными *фосфатазами* или *нуклеотидазами* до нуклеозидов и P_i . Мало что известно об индивидуальных ферментах и их специфичности, хотя, вероятно, существует много различных ферментов такого типа. Специфическая кишечная *фосфатаза* расщепляет аденозин-5'-фосфат, но не действует на изомерные аденозин-3'-фосфат и аденозин-2'-фосфат. Нуклеозиды, вероятно, не гидролизуются в кишечнике, а абсорбируются как таковые. Экстракты различных тканей — селезенки, печени, почек, костного мозга — расщепляют N-гликозидную связь нуклеозидов. Метаболизм этих соединений идет преимущественно в этих тканях. Так называемые *нуклеозидазы* не были интенсивно исследованы или очищены, и знания об этих ферментах весьма фрагментарны, однако специфические *пиримидин-нуклеозидазы* были идентифицированы.

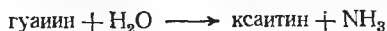
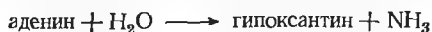


Расщепление N-гликозидной связи нуклеозидов происходит также при реакции, катализируемой специфическими нуклеозидфосфорилазами (разд. 24.1.3.1).

24.2.1.2. Катаболизм пуринов

У млекопитающих большая часть азота вводимых аденина, гуанина, ксантина или гипоксантина появляется в моче в виде мочевой кислоты или аллантаина. Следовательно, пуриновое кольцо расщепляется неполностью, и только небольшие количества аммония и мочевины поступают из этого источника.

Адениндезаминаза и *гуаниндезаминаза* являются специфическими дезаминазами, работающими гидролитически.



Гуаниндезаминаза присутствует в печени, почках, селезенке и т. д. Адениндезаминаза присутствует в микроорганизмах и беспозвоночных, но не в тканях млекопитающих. Аденозин-5'-фосфат необратимо дезаминируется под действием *дезаминазы адениловой*

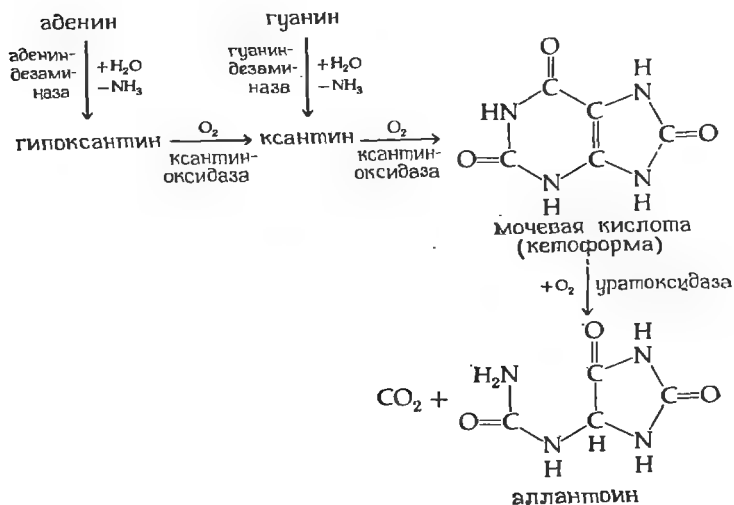


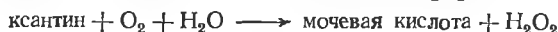
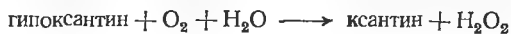
Рис. 24.4. Метаболический распад аденина и гуанина.

кислоты, которая в больших количествах содержится в мышцах (гл. 36) и других тканях.

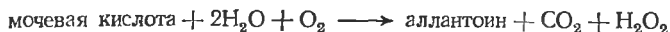


Инозиновая кислота, которую обнаруживают в мышцах, отражает, скорее всего, высокую активность дезаминазы адениловой кислоты, а не скорость синтеза пуринов *de novo*. Гуанозин- и аденозиндезаминазы также были обнаружены в животных тканях.

Ксантинооксидаза (разд. 13.6.2) является флавиновым ферментом и катализирует окисление как гипоксантина, так и ксантина.



Образование мочевой кислоты у млекопитающих происходит в печени и в слизистой кишечника. У большинства млекопитающих мочевая кислота аэробно окисляется с помощью печеночного фермента уратоксидазы, который является медьсодержащим белком (разд. 13.6.3).



Этапы деградации пуринов от аденина и гуанина до мочевой кислоты суммированы на рис. 24.4.

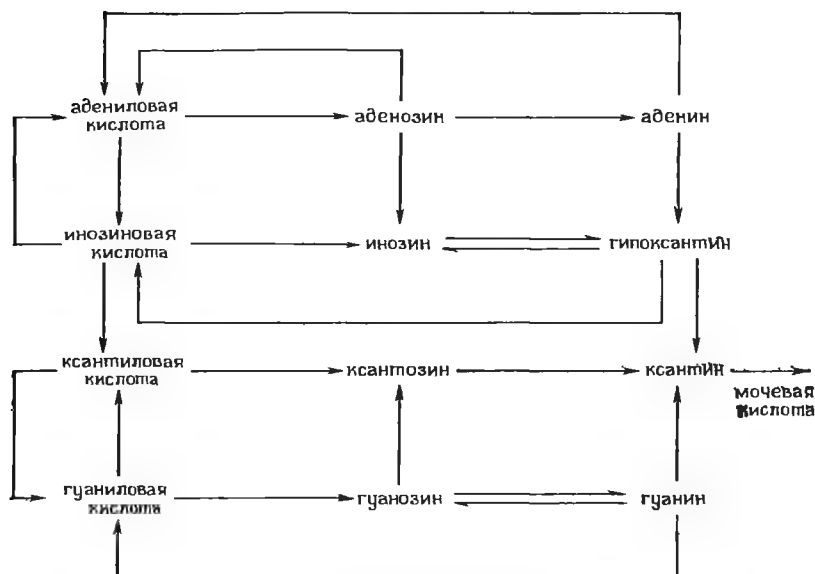


Рис. 24.5. Суммарная схема взаимопревращений пуриновых производных.

Как и у птиц, у человека и других приматов нет уратоксидазы; поэтому мочевая кислота является конечным продуктом пуринового метаболизма этих животных. Другие млекопитающие, у которых есть уратоксидаза, экскретируют аллантоин в качестве конечного продукта метаболизма пуринов. Далматские собаки, хотя и имеют, как и другие собаки, уратоксидазу в печени, но экскретируют мочевую кислоту из-за отсутствия реабсорбции мочевой кислоты почками. Свиньи, у которых недостаточно гуаниндезаминазы, экскретируют гуанин и аллантоин. Для свиней описана гуаниновая подагра, обусловленная отложением в суставах кристаллов гуанина, аналогично подагре человека, при которой моноватриевая соль мочевой кислоты накапливается в хряще (см. ниже). Гуанин является конечным продуктом метаболизма пуринов у пауков.

Использование свободных гуанина и аденина для синтеза нуклеотидов или нуклеиновых кислот в различных тканях зависит от относительной активности соответствующих дезаминаз и оксидаз по отношению к активности ферментов, которые способны превращать эти пурины в нуклеотиды. Таким образом, некоторые ткани способны утилизировать аденин и гуанин для синтеза нуклеиновых кислот, используя запасные пути (разд. 24.1.3), а другие не могут.

Суммарная схема взаимопревращений пуриновых производных (рис. 24.5) показывает, что реакции могут идти на уровне нуклеотидов, нуклеозидов и свободных оснований. Не все из этих реакций идут в каждой ткани или у каждого вида, но есть данные в пользу каждого из показанных путей. Из всех приведенных путей только два являются обратимыми в той же самой ферментативной системе. Реакции включают окисление, гидролиз, пирофосфоролиз и фосфоролиз. Можно полагать, что первые три типа реакций

практически необратимы. В большинстве случаев пути биосинтеза и соответствующие ферменты отличаются от таковых для расщепления; это отражено на диаграмме отдельными стрелками для различных путей.

24.2.1.3. Образование мочевой кислоты у человека

Образование и экскреция мочевой кислоты у человека идут с примерно равными скоростями при отсутствии пуринов в пище. Мочевая кислота образуется при эндогенном пуриновом метаболизме и, как и многие компоненты, отражает равновесное состояние, при котором скорости синтеза и катаболизма пуринов, измеряемые по экскреции мочевой кислоты, примерно равны. Некоторые продукты, такие, как молоко, сыр и яйца, содержат мало пуринов, тогда как другие продукты, богатые нуклеиновыми кислотами, такие, как печень и зубная железа, содержат большие количества пуринов.

24.2.1.4. Подагра

Концентрация мочевой кислоты в нормальной плазме крови составляет от 2 до 7,5 мг/100 мл и у взрослых составляет в среднем 4,1 мг/100 мл для женщин и примерно 5 мг/100 мл для мужчин. Растворимость натриевой соли мочевой кислоты в жидкостях организма составляет 6,4 мг/100 мл. При подагре большие количества натриевой соли мочевой кислоты концентрируются в виде *подагрических отложений* в хрящах. Отложения мочевой кислоты образуют также камни в почках, что приводит к повреждению почек. Большая часть всех почечных камней состоит из плохо растворимых мочевой кислоты и ее солей.

Только в 5% случаев подагра обнаружена у женщин. Подагра является наследственным заболеванием, хотя ее генетика очень сложна. Гиперурикемия (повышенное содержание мочевой кислоты в крови) часто наблюдается у асимптоматических родственников-мужчин подагриков. В большинстве случаев первичной причиной подагры является гиперпродукция мочевой кислоты. Однако гиперурикемия может быть обусловлена и другими факторами, такими, как нарушение почечной функции, токсемия беременности, повышенное кровяное давление и лейкокемия.

Больных, страдающих подагрической или другими видами гиперурикемии, лечат аллопуринолом, аналогом гипоксантина. Так как это соединение является специфическим ингибитором ксантиноксидазы, то это приводит к некоторому понижению уровня мочевой кислоты в крови и моче. Аллопуринол (4-оксипиразоло[3,4-d]пиримидин) также связывает PRPP, образуя аллопуринолнуклеотид. Аллопуринол медленно окисляется до соответствующего ана-

действия ферментов *аллантиназы* и *аллантакиназы* (разд. 24.2.1.6). У некоторых видов образующаяся мочевина может гидролизовать-ся до NH_3 и CO_2 с помощью *уреазы* микроорганизмов, живущих в кишечнике.

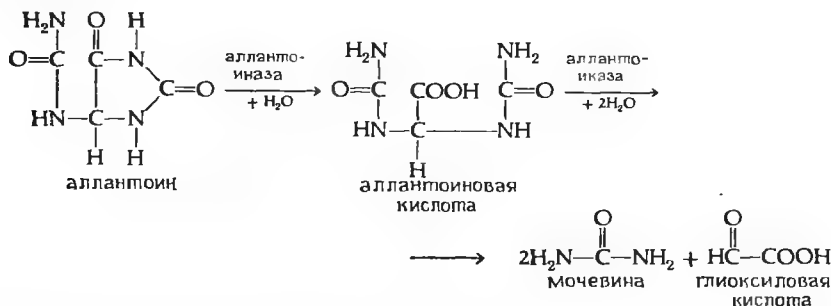
Биологические вариации конечных продуктов пуринового метаболизма суммированы в табл. 24.1. Птицы и некоторые рептилии, которые не синтезируют мочевину, направляют почти весь амино-

Таблица 24.1

Конечные экскретируемые продукты пуринового метаболизма

Экскретируемые продукты	Группы животных
Мочевая кислота	Приматы, далматская собака, птицы, некоторые рептилии (змеи и ящерицы)
Аллантоин	Млекопитающие (кроме приматов), некоторые рептилии (черепахи), гастроподовые моллюски
Аллантоиновая кислота	Некоторые рыбы
Мочевина	Большинство рыб, амфибии, пресноводные пластинчатожаберные моллюски
Аммоний	Некоторые морские беспозвоночные, ракообразные и т. д.

кислотный азот на образование глицина, аспарагиновой кислоты и глутамина. Общее образование пуринов значительно превышает потребность в пуриновых нуклеотидах, и мочевая кислота является главным конечным продуктом метаболизма пуринов у этих видов. Виды, которые экскретируют азот преимущественно в виде мочевой кислоты, называют урикотелическими в отличие от уреотелических, которые экскретируют азот преимущественно в виде мочевины.



Аргиназа присутствует в печени позвоночных с уреотелическим метаболизмом, но отсутствует в печени животных с урикотелическим метаболизмом. Таким образом, природа конечных продуктов метаболизма пуринов и аминокислот за-

висит от сохранности небольшой группы ферментов. В отсутствие аргиназы аминокислотный азот у урикоотеликов включается в пурины. Следует напомнить, что азот глицина, глутамина и аспарагиновой кислоты непосредственно используется для образования пуриновых нуклеотидов. С помощью переаминирования и образования глутамина (гл. 20) дополнительный аминный азот и аммиак могут быть поставлены для образования пуринов и, следовательно, для удаления в виде мочевой кислоты.

Так как у высших животных распад пуринов гораздо менее глубокий, то очевидно, что часть фермента была утрачена при эволюции животных, например уратоксидаза, аллантоиназа, аллантонказа и уреаза.

24.2.1.7. Катаболизм пиримидинов

Деаминирование цитидина в уридин с помощью цитидиндезаминазы было продемонстрировано для многих животных тканей и бактерий. Цитозин и метилцитозин деаминируются с образованием урацила и тимина. Известные в настоящее время пути деградации урацила и тимина показаны на рис. 24.6.

Метаболизм урацила и тимина начинается реакциями *восстановления*, приводящими к дигидроурацилу и дигидротимину, которые затем гидролизуются *гидропиримидингидразой* в β -уредопроизводные. Дальнейший гидролиз приводит к β -аминокислотам. Утилиза-

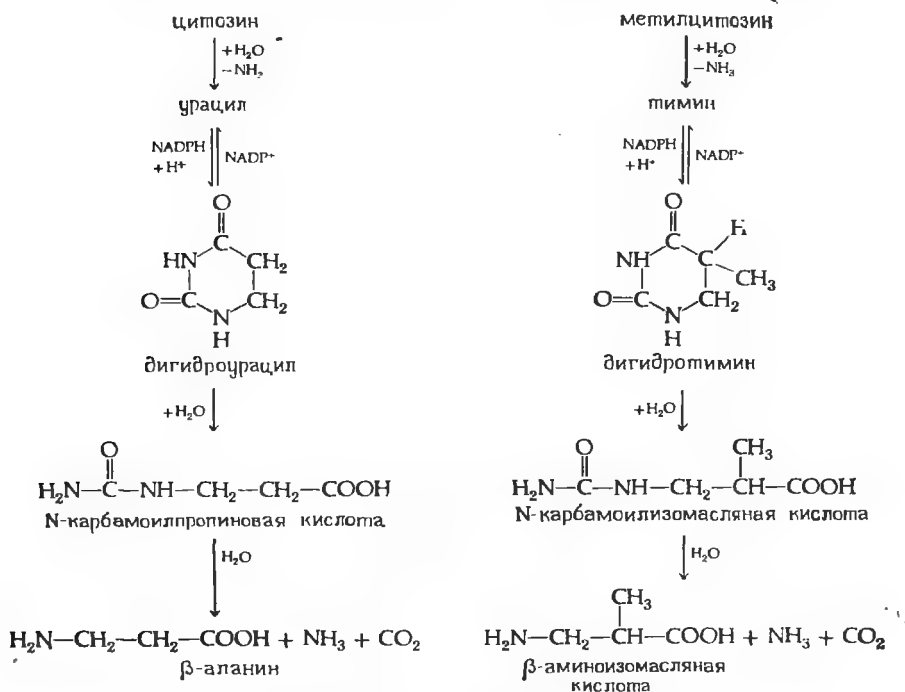


Рис. 24.6. Метаболизм свободных пиримидинов.

ция и судьба β -аланина уже обсуждались (разд. 22.5.2). β -Аминоизобутират может превращаться в метилмалонат; судьба CoA-производного этого соединения уже обсуждалась (разд. 17.5.9). β -Аминоизобутират был обнаружен в моче некоторых особей в количестве до 200—300 мг в день или вследствие наследственных особенностей, или заболевания. Он выделяется в повышенных количествах после кормления пищей, богатой ДНК. Повышенный уровень обнаруживается также у некоторых раковых больных.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

- Davidson J. N.* The Biochemistry of the Nucleic Acids, 8th ed., R. P. L. Adams, R. H. Burdon, A. M. Campbell, and R. S. Smellie, eds., Academic Press, Inc., New York, 1977.
- Greenberg D. M.*, ed. Metabolic Pathways, vol. IV, chaps 19 and 20, Academic Press, Inc., New York, 1970.
- Henderson J. F.* Regulation of Purine Biosynthesis, Am. Chem. Soc. Monog. 170, Washington, D. C., 1972.
- Henderson J. F.*, *Paterson A. R. P.* Nucleotide Metabolism, Academic Press, Inc., New York, 1972.
- Kornberg A.* DNA Synthesis, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1974.
- Reichard P.* The Biosynthesis of Deoxyribose, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1967.
- Stanbury J. B.*, *Wyngaarden J. B.*, *Fredrickson D. S.*, eds. The Metabolic Basis of Inherited Disease, 3d ed., McGraw-Hill Book Company, New York, 1972 (See Part VI, Disorders of Purine and Pyrimidine Metabolism).

Обзорные статьи

- Buchanan J. M.*, *Hartman S. C.* Enzymic Reactions in the Synthesis of Purines, Adv. Enzymol., 21, 199—261, 1959.
- Hitchings G. H.* Indications for Control Mechanisms in Purine and Pyrimidine Biosynthesis as Revealed by Studies with Inhibitors, Adv. Enzyme Regul., 9, 121—129, 1974.
- Jones M. E.* Regulation of Pyrimidine and Arginine Biosynthesis in Mammals, Adv. Enzyme Regul., 9, 19—49, 1971.
- Jones M. E.* Regulation of Uridylic Acid Biosynthesis in Eukaryotic Cells, Curr. Top. Cell. Regul., 6, 227—265, 1972.
- Kornberg A.* Pyrophosphorvases and Phosphorylases in Biosynthetic Reactions, Adv. Enzymol., 18, 191—240, 1957.
- Larsson A.*, *Reichard P.* Enzymatic Reduction of Ribonucleotides, Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol., 7, 303—347, 1967.
- Murray A. W.* The Biological Significance of Purine Salvage Annu. Rev. Biochem., 50, 811—836, 1971.
- Murray A. W.*, *Elliott D. C.*, *Atkinson M. R.* Nucleotide Biosynthesis from Preformed Purines in Mammalian Cells: Regulatory Mechanisms and Biological Significance, Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol., 10, 87—119, 1970.
- Reichard P.* The Enzymic Synthesis of Pyrimidines, Adv. Enzymol., 21, 263—294, 1959.
- Seegmiller J. E.*, Diseases of Purine and Pyrimidine Metabolism, pp. 655—774, in: P. K. Bondy, ed. Duncan's Diseases of Metabolism, 7th ed., vol. 1, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1974.

Номенклатура

- Номенклатура ферментов: Vitamins, Coenzymes and Related Compounds, J. Biol. Chem., 241, 287, 1966; 245, 4229, 1970.

Глава 25

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МЕТАБОЛИЗМА. I

Природа гена. Синтез и репарация ДНК.

Модификация и рестрикция ДНК.

Хромосомы и хроматин.

Манипуляции генетическими элементами.

*Отношение последовательности ДНК
к последовательности и структуре белка*

Правильное понимание химических основ наследственности требует ответа на следующие вопросы: 1) Из какого материала построены гены? 2) Как гены реплицируются таким образом, что при клеточном делении каждая дочерняя клетка получает тот же комплект генетического материала, что и родительская клетка? 3) Как происходит экспрессия генов, т. е. с помощью каких механизмов гены определяют химические, метаболические и морфологические характеристики индивидуальной клетки или организма?

25.1. Гены и метаболизм

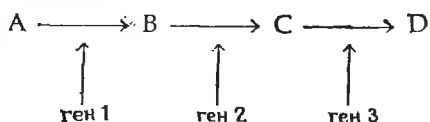
Наследственность обусловлена генами. Способ наследования характерных признаков, обусловленных отдельными генами, сейчас хорошо изучен экспериментально на многих видах, которые имеют половую дифференцировку — необходимое условие для выявления наличия и поведения отдельных генов в диплоидных организмах. Менделевские законы наследственности справедливы для человека, как и для остальных видов, и были описаны многие проявления различий в отдельных генах.

Общее представление о том, что один ген может контролировать только один этап метаболизма, возникло при изучении низших организмов (см. ниже) и аномалий у человека и других животных, у которых блокированы метаболические реакции. Прекрасным примером является метаболический дефект, называемый алкаптонурия (разд. 23.2.11), который рецессивно наследуется у человека и обусловлен неспособностью окислять гомогентизиновую кислоту, нормальный промежуточный продукт метаболизма тирозина. Другие аномалии метаболизма фенилаланина и тирозина у человека, такие, как фенилкетонурия, тирозиноз и альбинизм, также являются наследственными и обусловлены единич-

ными генными факторами. В каждом из этих случаев изменение одного гена — *мутация* — приводит к неспособности клетки проводить специфическую метаболическую реакцию.

Генетические исследования на хлебной плесени *Neurospora crassa* подтвердили информацию, ограниченно доступную на других объектах, относительно влияния отдельных генов. Так как споры *Neurospora* гаплоидны, они содержат по одному экземпляру всех семи хромосом и, следовательно, всех генов. Каждый *аск* дикого типа содержит восемь идентичных спор, каждая из которых может быть выделена и проанализирована индивидуально. При скрещивании мутанта с диким типом четыре споры проявляют свойства дикого типа, а четыре — мутантного. Штамм дикого типа можно культивировать на минимальной среде, содержащей глюкозу, неорганический источник азота, соли и биотин. Мутанты могут быть получены облучением ультрафиолетовыми или рентгеновскими лучами. Если облученная спора может расти на минимальной среде, то мутация не произошла. Если не может, но растет на среде, обогащенной аминокислотами, витаминами, пуринами, пиримидинами или другими добавками, то она подвергается дальнейшему исследованию для определения того, чем является недостающий фактор — витамином, аминокислотой и т. д. Тестирование проводят сначала на большие группы соединений, затем на меньшие и, наконец, на индивидуальные вещества. Таким образом можно обнаружить индивидуальные мутанты, утратившие способность синтезировать определенную аминокислоту, один из витаминов группы В, пурин или пиримидин.

Допустим, что для роста некоторого мутантного штамма необходимо соединение D. Так как синтез может включать ряд стадий, то метаболический блок может быть в любой точке цепи синтеза, начиная от предшественника A.



Если изменен ген 3 и блокировано превращение $C \rightarrow D$, то для того, чтобы восстановить рост, необходимо добавить вещество D. Если изменен ген 1, то мутант будет расти при добавлении любого из продуктов — B, C или D. Таким образом, изменения нескольких различных генов приводят к потребности в соединении D, хотя метаболический блок может затронуть любую стадию. Например, *Neurospora* дикого типа может синтезировать аргинин из аммония, а некоторые мутанты не могут расти, если в среду не добавить аргинин. Некоторые из этих штаммов могут расти только в при-

существовании аргинина, другие могут использовать цитруллин и аргинин, а третьи — орнитин, цитруллин или аргинин. Очевидно, что последовательность стадий в этом случае должна быть $X \rightarrow \text{орнитин} \rightarrow \text{цитруллин} \rightarrow \text{аргинин}$, точно такая же, как и у млекопитающих (разд. 21.4.3.5). Такого рода исследования сильно ускорили выяснение путей биосинтеза таких аминокислот, как лизин, триптофан, гистидин и т. д.

Во всех исследованных случаях было показано, что мутация одного гена ведет к утрате активности одного специфического фермента. Таким образом, гены контролируют определенные метаболические реакции, контролируя биосинтез ферментов. Это нашло отражение в утверждении «один ген — один фермент»*. Такие же исследования, как на *Neurospora*, были проведены на мутантах вирусов, бактерий, высших растений и животных.

25.2. Материальный носитель генов — ДНК

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что гены контролируют синтез ферментов, но не дают никакой информации о химической природе гена. Множество данных указывает на то, что материальным носителем генов является ДНК.

1. Содержание ДНК в клетке строго постоянно для каждого вида, что согласуется с ролью ДНК как носителя генетической информации.

2. Мутации генов могут быть вызваны ультрафиолетовым облучением. Спектр действия образования мутаций хорошо соответствует спектру поглощения нуклеиновых кислот. Сходным образом физические и химические агенты, способные вызвать мутации, изменяют нуклеиновые кислоты.

3. Различные вирулентные штаммы пневмококков имеют химически различные капсульные полисахариды. Бескапсульные клетки одного типа могут быть трансформированы в культуре в капсулярные клетки другого типа введением ничтожного количества ДНК, выделенной из капсульных организмов. Этот эффект называется трансформацией. Так, ничтожное количество ДНК из капсулярных пневмококков типа III индуцирует образование бескапсульным пневмококком типа II полисахаридов типа III. Аналогичным образом ДНК из различных штаммов бактерий использовали для

* Следует подчеркнуть, что само понятие «ген» в последние годы существенно изменилось (показано перекрывание структурных генов у некоторых бактериофагов, а именно одни и те же последовательности генома могут кодировать более одного белка) за счет нестрогой термминации трансляции или сдвига рамки считывания. Кроме того, некоторые участки внутри структурных генов эукариот (так называемые интроны) не находят отражения в продуктах генов. — Прим. перев.

трансформации различных членов этого же вида по другим признакам. ДНК работает как генетический фактор во всех этих случаях, так как трансформированные клетки размножаются дальше как индуцированные, без добавления трансформирующего фактора.

4. Большинство вирусов бактерий (бактериофагов) и многие животные вирусы содержат только ДНК и белок. Для бактериофага Т2 (гл. 28) было показано, что перенос генетической информации к потомству осуществляется исключительно с помощью ДНК. Белок служит только для того, чтобы сделать возможным проникновение ДНК внутрь клетки, и далее не используется.

Вся приведенная выше информация обосновывает тот факт, что генетическим материалом является ДНК. Поэтому ДНК должна обладать основными свойствами гена. Она должна обеспечивать синтез точной реплики самой себя, должна обладать способностью направлять синтез ферментов и других белков. Детали этих процессов будут обсуждены в этой и следующих трех частях.

Говоря коротко, репликация ДНК является полуконсервативным процессом (см. ниже), который начинается в определенной точке и приводит к одновременному копированию обеих цепей двуединицевой ДНК (дуплекса). Мономерными единицами, используемыми в этом процессе, являются дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты. Полимеризация нуклеотидов идет в результате нуклеофильной атаки 3'-гидроксидной группой растущей цепи ДНК по нуклеотидной фосфатной группе дезоксирибонуклеозидтрифосфата с образованием 3',5'-фосфодиэфирной связи и PP_i . Цепь, комплементарная растущей цепи, служит матрицей и определяет последовательность полимеризующихся нуклеотидов, чтобы образовались комплементарные пары — аденина с тиминном и гуанина с цитозинном.

Выражение генетического материала достигается путем синтеза РНК-транскрипта, который комплементарен одной из двух цепей двуединицевой ДНК (дуплекса). При этом образуются три типа РНК — транспортная (тРНК), рибосомная (рРНК) и информационная, или матричная (мРНК). Последняя транслируется в белок с помощью тРНК и частиц, содержащих рРНК и называющихся рибосомами.

25.2.1. Некоторые генетические методы

Хотя классические генетические исследования были проведены преимущественно на диплоидных животных и растениях (эукариотах), драматические успехи были достигнуты на одноклеточных гаплоидных микроорганизмах, таких, как бактерии *E. coli* и *Salmonella typhimurium*, а также на бактериофагах *E. coli*. У высших организмов гаплоидны только гаметы — яйцеклетки и спермии, остальные (соматические) клетки диплоидны. У аскомицетов (*Neuro-*

spora, Aspergillus, различные дрожжи) клетки гаплоидны только в вегетативной фазе. Экспериментально возможно заменить часть генетического материала у бактерий и фагов; эта замена сопровождается вегетативным диплоидным состоянием организма. Некоторые из этих методов коротко описаны ниже.

Между клетками *E. coli* может происходить генетическая рекомбинация. У этого организма имеются два скрещивающихся типа, обозначаемых F^+ (мужской) и F^- (женский). Клетки F^+ имеют автономную ДНК, называемую F-фактором или половым фактором, который при контакте F^+ - и F^- -клеток может переходить в F^- -клетки, переводя их в F^+ -состояние. Обладание F^+ -фактором отражает способность клетки переносить хромосомный материал в клетку-реципиент. Переносимый хромосомный материал поступает в клетку-реципиент линейно, сохраняя последовательность генов. Прерывая спаривание через определенные промежутки времени и определяя экспрессию генов в реципиентной клетке, можно определять последовательность (картировать) расположение генов в хромосоме.

Другую возможность генетического обмена дает трансдукция, которая проявляется у некоторых типов бактериофагов. При росте в клетке-хозяине фаги могут включать небольшие фрагменты генетического материала хозяина и затем переносить этот материал в реципиентную клетку при инфицировании. Этот метод был применен, в частности, на штамме K-12 *E. coli* и на различных штаммах *Salmonella*. Если бактериальную клетку, например *E. coli*, инфицировать одновременно двумя фаговыми частицами, которые отличаются по одному или более генов, идет процесс, очень похожий на рекомбинацию хромосом (кроссинговер) у высших организмов. В результате этого в потомстве можно обнаружить как чистые родительские генотипы, так и рекомбинантные. Исследование бактериофага T4 с помощью этого метода позволило создать кольцевую карту расположения генов на единственной хромосоме этого вируса. У многих бактерий и ДНК-содержащих вирусов генетический материал расположен на единственной кольцевой хромосоме.

Изучение генетики и генетических аспектов метаболизма особенно удобно проводить на гаплоидных микроорганизмах. Мутации, которые возникают спонтанно или индуцируются с высокой частотой (облучением, нагреванием, алкилирующими агентами), проявляются немедленно, и продолжительность генерации исключительно мала. Более того, потребности для роста обычно просты, количество генов по сравнению с высшими организмами мало, и мутанты легко выделить. Особенно ценный метод для выделения мутантов, неспособных расти без добавки определенных компонентов в питательную среду (ауксотрофов), сводится к использованию пенициллина, который убивает только растущие клетки. Если

смесь бактерий дикого типа и ауксотрофа растить на минимальной среде, содержащей пенициллин, то бактерии дикого типа будут расти и погибнут, а ауксотрофные клетки останутся живы и начнут расти при переносе на среду с добавлением необходимого фактора роста, например аминокислоты, пурина, пириимидина, витамина и т. д. На предыдущих страницах этой книги много раз упоминалось использование мутантных штаммов для выяснения метаболических путей; многие из этих штаммов были выделены с помощью пенициллинового метода.

25.3. Полуконсервативная репликация ДНК

Как уже отмечалось (гл. 7), гипотеза Уотсона и Крика о структуре нативной ДНК сводится к тому, что каждая молекула ДНК представляет собой двухнитевую спираль, в которой обе нити свя-

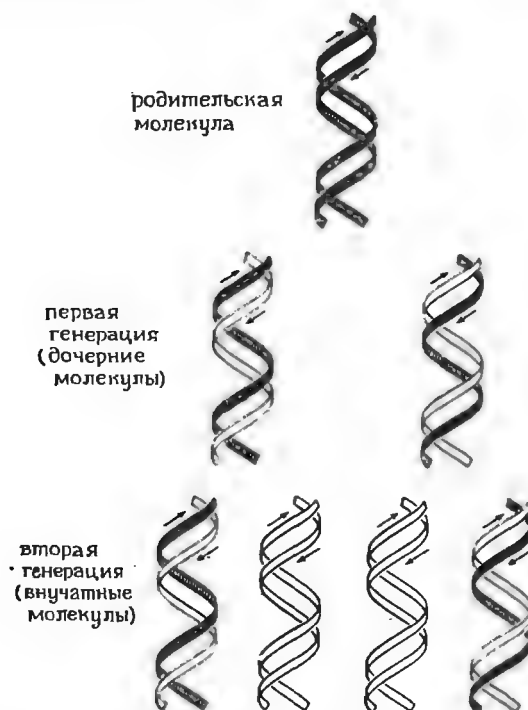


Рис. 25.1. Полуконсервативная репликация ДНК. Две нити родительской молекулы (черные) содержат ^{15}N . В дочерних молекулах каждая ДНК содержит одну нить с ^{15}N и одну с ^{14}N . Во второй генерации две молекулы содержат только ^{14}N , а две молекулы равное количество ^{15}N и ^{14}N . Стрелки показывают направление цепей, учитывая, что фосфодиэфирная связь соединяет С-3' и С-5' соседних остатков сахара (Meselson M., Stahl F., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 23, 10, 1953).

заны водородными связями с участием специфических аминокислотных и кетогрупп: аденин (А) с тиминном (Т), гуанин (Г) с цитозином (С). На основе этого было предположено, что репликация может идти путем разделения двух цепей и образования на них новых цепей таким образом, чтобы нуклеотиды новых цепей были комплементарны старой цепи. Таким образом, каждая цепь должна служить матрицей для образования новой цепи ДНК, которая не идентична, а комплементарна матрице. По окончании этого процесса должны образоваться две новые двунитевые молекулы ДНК, одна нить в которых служила матрицей, а вторая синтезирована вновь.

Первое подтверждение этой гипотезы было получено в опытах, в ходе которых *E. coli* выращивали на среде с $[^{15}\text{N}]$ и вся ДНК была мечена $[^{15}\text{N}]$. Затем бактериальные клетки тщательно отмывали и проводили одно синхронизованное клеточное деление в среде, где весь азот был в виде $[^{14}\text{N}]$. При этом общее количество ДНК в культуре удваивается. Изопикническим центрифугированием в концентрированном растворе CsCl (разд. 7.2.7) было показано, что ДНК в этой культуре не представляет собой смесь двух ДНК — одной с ^{14}N и другой с ^{15}N ; но вся ДНК представляет собой гибрид, содержащий равные количества ^{14}N и ^{15}N . Такого результата можно было ожидать при описанном выше механизме репликации. Во время репликации двунитевая молекула ^{15}N -ДНК разделяется на две одиночные нити, каждая из которых в свою очередь служит матрицей, на которой синтезируется ^{14}N -ДНК, что приводит к образованию гибридной двунитевой молекулы, одна нить которой содержит ^{15}N , а другая — ^{14}N . Этот процесс, называемый полуконсервативной репликацией, схематически показан на рис. 25.1.

25.3.1. Топология репликации ДНК

Радиоавтографические и электронно-микроскопические наблюдения реплицирующихся молекул бактериальной и вирусной ДНК показали, что реплицируются одновременно обе нити и репликация начинается в определенной фиксированной точке и идет в одном или в обоих направлениях. В случае кольцевой молекулы ДНК, как, например, хромосомы *E. coli* (табл. 7.4), репликация идет в двух направлениях. Средняя скорость, с которой две точки роста, или *репликационные вилки*, двигаются при репликации этой хромосомы, составляет примерно 45 000 оснований на вилку в минуту при 37°C . Так как на один оборот спирали приходится 10 пар оснований, то скорость раскручивания исходного дуплекса в каждой вилке составляет примерно 4500 об/мин (рис. 25.2).

В связи с тем что при раскручивании в одной вилке исходный дуплекс должен вращаться в противоположную сторону по срав-

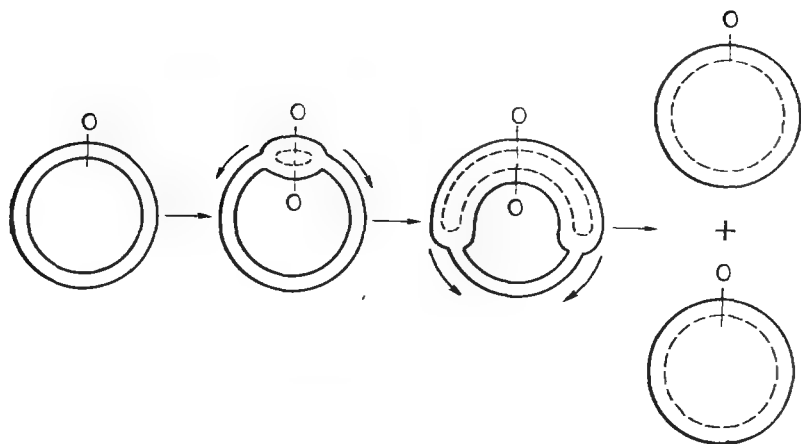


Рис. 25.2. Репликация кольцевой молекулы ДНК в обе стороны, начиная с фиксированной точки О. Тонкие линии обозначают вновь синтезированную нить, а стрелки показывают направление движения двух репликационных вилок. Для простоты не показана спиральная структура двухнитевой ДНК.

нению с тем, что необходимо для раскручивания в другой вилке, молекула ДНК должна содержать шарнир. Такой шарнир может возникнуть при расщеплении одной фосфодиэфирной связи в исходном дуплексе под действием дезоксирибонуклеазы. Действительно, были обнаружены белки, способные снимать супервитки у сверхскрученной кольцевой ДНК (гл. 7), вероятно, путем расщепления и воссоединения фосфодиэфирной связи. Такие раскручивающие белки, или «расплетазы», могут облегчить раскручивание при расплетании двух цепей во время репликации кольцевой молекулы ДНК. Были также обнаружены ферменты, названные *ДНК-гиразами*, которые катализируют образование супервитков в кольцевой ковалентно замкнутой ДНК.

Репликация линейной молекулы ДНК бактериофага Т7 также начинается в одной точке и идет одновременно в обе стороны. Эта точка отстоит от одного конца молекулы ДНК на 6500 пар оснований. Из-за асимметричного расположения точки начала репликации на ДНК сначала образуется «глаз» из двух репликационных вилок, а затем, когда одна из вилок достигает конца ДНК, возникает Y-образная форма, до тех пор пока не кончится репликация и во второй вилке (рис. 25.3).

Начало репликации в одном или обоих дочерних дуплексах можно инициировать до того, как закончится репликация родительской Т7 ДНК, так что более чем две вилки могут работать одновременно на одном промежуточном репликационном комплексе. Это дает возможность быстрее увеличивать количество реп-

лик одной родительской ДНК без увеличения скорости продвижения вилки или инициации репликации в других точках молекулы ДНК фага Т7. Аналогичное ускорение активации инициации репликации наблюдается, в определенных условиях, и для кольцевой хромосомы *E. coli*.

Скорость движения вилки при репликации эукариотных хромосом почти на порядок ниже, чем у *E. coli*, хотя их очень длинная молекула ДНК (табл. 7.4) может быть реплицирована за более короткое время, чем необходимо для репликации хромосомы *E. coli*. Большая скорость репликации достигается благодаря последовательному расположению точек инициации, на каждой из которых образуется две репликационные вилки, двигающиеся

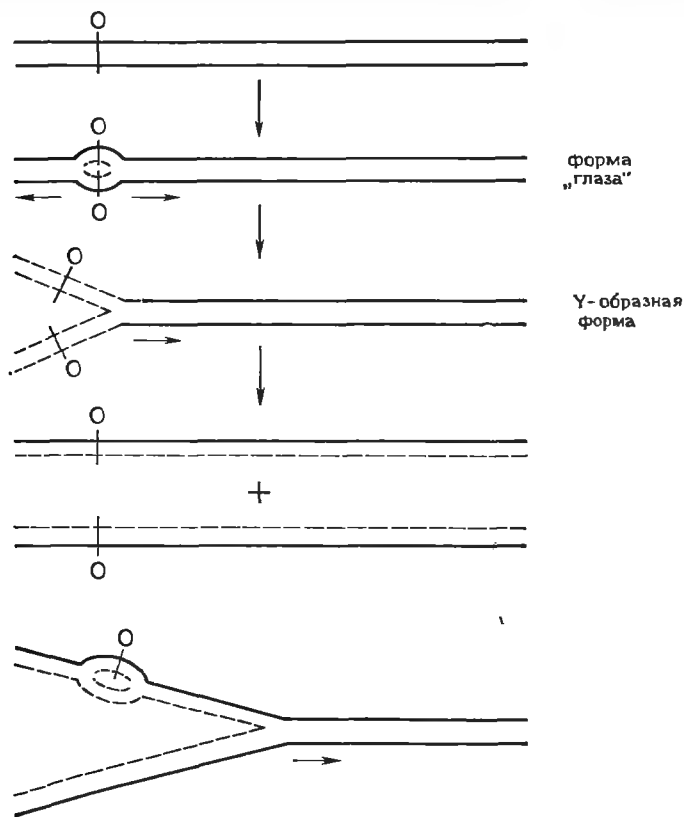


Рис. 25.3. Двухнаправленная репликация линейной ДНК бактериофага Т7. Репликация начинается в точке О, отстоящей от одного конца на 6500 пар оснований, и образует форму «глаза» и Y-образную форму. Последняя диаграмма иллюстрирует активацию репликации в одном из дочерних дуплексов до завершения репликации родительской молекулы ДНК.

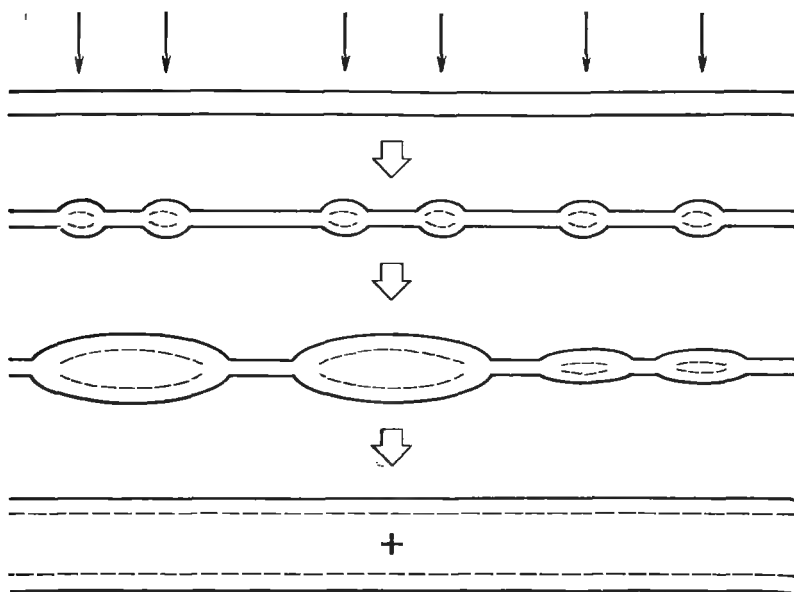


Рис. 25.4. Репликация очень длинной эукариотной молекулы ДНК. Тонкие стрелки показывают расположение точек инициации репликации, в каждой из которых возникают по две репликационные вилки, двигающиеся в противоположных направлениях.

в противоположные стороны. Топологические проблемы репликации, т. е. необходимость шарниров для раскручивания исходного дуплекса, точно такие же и в этом случае, как при репликации ДНК *E. coli* (рис. 25.4).

У различных животных и даже в ядрах различных клеток одного животного, расстояния между соседними точками инициации варьируют в широких пределах. Например, в оплодотворенных яйцах *Drosophila melanogaster*, вошедших в стадию быстрого клеточного деления, среднее расстояние между точками инициации составляет 7000—8000 пар оснований. Следовательно, если две вилки двигаются в противоположных направлениях со скоростью всего 2000 пар оснований на вилку в минуту, то полная репликация длинной хромосомной ДНК дрозофилы может быть завершена за несколько минут.

Интересным примером однонаправленной репликации с использованием одной репликационной вилки является *катящееся кольцо*. Такой механизм был обнаружен у некоторых вирусов (например, у бактериофага ϕ X174). Было показано, что с помощью этого механизма амплифицируются гены рибосомальной РНК

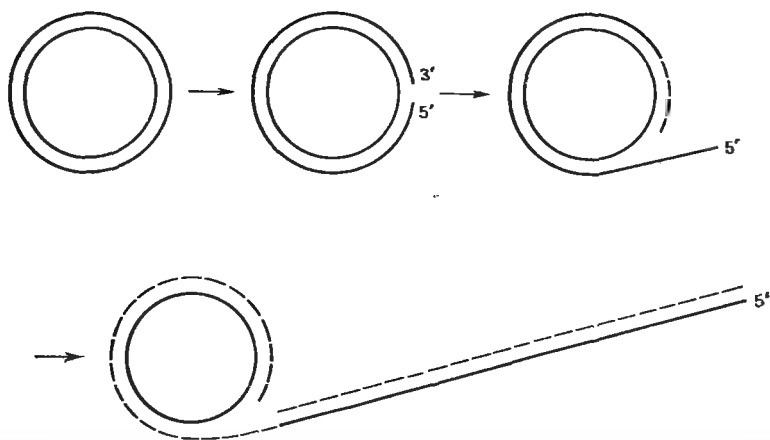


Рис. 25.5. Репликация в одном направлении кольцевой замкнутой двухнитевой молекулы ДНК по механизму катящегося кольца. Процесс начинается с расщепления фосфодиэфирной связи в одной из нитей. Удлинение 3'-конца и вытеснение 5'-конца цепи образует репликационную вилку. Кольцевая нить представляет собой бесконечную матрицу. Когда синтезированный участок становится длиннее матрицы и содержит гомологическую последовательность более длины одного генома, то образовавшаяся молекула подвергается расщеплению, вероятно, под действием эндонуклеазы.

(разд. 25.3.6.1) в ооцитах южноафриканской шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. При этом расщепление единственной фосфодиэфирной связи в ковалентно замкнутой кольцевой ДНК предоставляет «праймер» для удлинения цепи на 3'-конце. Репликация вокруг кольца является, таким образом, вытеснением 5'-фосфатного конца молекулы, который может быть связан с некими структурами, что приводит к образованию единственной репликационной вилки. Вытесненная цепь может затем реплицироваться в направлении от 5'-к 3'-концу. В сущности катящееся кольцо дает возможность тандемного расположения повторяющихся последовательностей на матрице с единичной последовательностью (рис. 25.5).

25.3.2. Ферменты репликации ДНК

25.3.2.1. Прокариотические ДНК-полимеразы

Хотя модель Уотсона — Крика (гл. 7) дает общее представление о том, как может идти репликация ДНК, она не дает представления о химических процессах, протекающих при этом. Исследование механизма синтеза ДНК в экстрактах *E. coli* привело к идентификации и последующему выделению фермента — ДНК-полимеразы, которую сейчас обозначают ДНК-полимераза I. Этот

«большого» фрагмента (M 76 000), который содержит полимеразную и $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазную активности, и малого фрагмента (M 36 000), содержащего только $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазную активность. Таким образом, ДНК-полимераза I содержит по крайней мере две различные ферментативные активности в одной полипептидной цепи.

Полимеразная и $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазная активности ДНК-полимеразы I могут работать координированно, катализируя одновременно включение нуклеотида по $3'$ -концу и удаление нуклеотида с $5'$ -конца в одонитевом разрыве двунитевой ДНК. Суммарный эффект такого совместного действия $5' \rightarrow 3'$ -полимеразы и $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазы — продвижение одонитевого разрыва вдоль молекулы ДНК. Такое перемещение разрыва или «трансляция ника» — возможный механизм удаления фотопродуктов, таких, как тиминовые димеры, при репликации поврежденных, возникающих при ультрафиолетовом облучении ДНК (разд. 25.3.3). Таким же способом может осуществляться удаление инициирующего фрагмента РНК из вновь синтезированной ДНК (разд. 25.3.2.3).

$3' \rightarrow 5'$ -Экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы I специфически гидролизует одонитевые ДНК и нарушенные неспаренные концы двунитевой ДНК. Эта активность в самом деле катализирует удаление неспаренных нуклеотидов на $3'$ -конце с образованием полностью спаренного комплекса праймер — матрица, который больше не является субстратом для действия экзонуклеазы. Так, $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеаза, действуя координированно с полимеразой, может удалять неправильно включенные нуклеотиды (не образующие комплементарную пару с основанием матрицы) и таким путем исправлять ошибки, которые были допущены во время полимеризации. Данные, полученные при анализе мутантов фага Т4 по гену, кодирующему индуцируемую фагом ДНК-полимеразу (гл. 28), свидетельствуют в пользу предположения о корректирующей функции $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазы при репликации ДНК. Единичная мутация такого рода резко повышает частоту мутаций (гл. 7) по всему геному фага Т4. По крайней мере в одном случае было показано, что такой мутаторный эффект ДНК-полимеразы является следствием дефекта $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной части мутантного фермента, что свидетельствует о том, что $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеаза играет определенную роль в коррекции ошибок при репликации ДНК.

В условиях, оптимальных для определения активности ДНК-полимеразы I, почти вся ДНК-полимеразная активность могла быть приписана этому ферменту. Так продолжалось до тех пор, пока не был получен жизнеспособный мутант *E. coli* с сильно пониженным уровнем ДНК-полимеразы I и были обнаружены и выделены еще две ДНК-полимеразы — II и III. ДНК-полимераза II очень похожа на ДНК-полимеразу I по катализируемым ими реакциям, но

не имеет $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазной активности. ДНК-полимераза III тоже похожа на I и содержит как $5' \rightarrow 3'$ -, так и $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазные активности.

Мутанты *E. coli* с термолабильной ДНК-полимеразой III неспособны расти и реплицировать ДНК при 42°C , но способны делать это при 30°C , следовательно, этот фермент необходим для репликации ДНК *in vivo*. У некоторых мутантов с поврежденной ДНК-полимеразой I также наблюдается нарушение репликации ДНК *in vivo* (разд. 25.3.2.3). Функции ДНК-полимеразы II до сих пор не описаны. Некоторые свойства ДНК-полимераз *E. coli* сопоставлены в табл. 25.1.

Таблица 25.1
Сопоставление ДНК-полимераз I, II и III *E. coli*

	I	II	III
Свойства			
<i>M</i>	110 000	120 000	180 000
число молекул на клетку	400	100	10
число оборотов ^a	1 000	50	15 000
Функции ^b			
полимеризация $5' \rightarrow 3'$	+	+	+
экзонуклеазная активность			
$3' \rightarrow 5'$	+	+	+
$5' \rightarrow 3'$	+	—	+

^a Число нуклеотидов, заподимеризованных в минуту на молекулу фермента при 37°C .

^b + наличие активности. — отсутствие активности. (Корнберг А., Синтез ДНК. Пер. с англ. — М.: Мир, 1977.)

25.3.2.2. Эукариотические ДНК-полимеразы

Эукариотические клетки, так же как и клетки *E. coli* и других прокариот, содержат несколько ДНК-полимераз. Однако в отличие от прокариотических эукариотические не обладают $3' \rightarrow 5'$ - и $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазными активностями. Преобладающий фермент (от 80 до 90% общего количества) называется α -ДНК-полимеразой (*M* 200 000—250 000); количество субъединиц еще не установлено. Вторая полимераз, β , представлена одной полипептидной цепью (*M* 45 000). Оба эти фермента локализованы в ядре. Третья ДНК-полимераза (*M* 106 000) обнаружена в митохондриях, она отличается от α - и β -ферментов и, вероятно, катализирует репликацию митохондриальной ДНК.

РНК-содержащие онкогенные вирусы (саркомы Роуса, птичьего миелобластоза, лейкемии Раушера, гл. 28) содержат в составе

вириона уникальную РНК-зависимую ДНК-полимеразу, которую часто называют *обратной транскриптазой*. Этот фермент может катализировать синтез ДНК-копии вирусной РНК, которая далее может интегрировать (встраиваться) в хозяйский геном. В таком *провирусном* состоянии вирусный геном может экспрессироваться, что приводит либо к размножению вируса, либо к образованию опухоли.

Обратная транскриптаза, выделенная из вируса птичьего миеобластога, была изучена наиболее подробно среди представителей этого класса ферментов. Она содержит два атома Zn^{2+} на молекулу фермента (M 170 000), который состоит из двух субъединиц M 105 000 и 65 000 соответственно. Ферментативная активность сосредоточена в малой субъединице, функции большой субъединицы неизвестны.

Вирусная РНК-зависимая ДНК-полимераза наиболее сильно отличается от клеточных полимераз своей способностью использовать в качестве комплекса праймер—матрица выделенную из вириона РНК. Эта РНК представляет собой 70S-комплекс, содержащий четыре 35S-компонента и от 12 до 40 фрагментов РНК с константой седиментации 4S. Одним из них является триптофановая тРНК (гл. 26), которая служит специфическим праймером в этой реакции. Обратная транскриптаза обладает также рибонуклеазной активностью, называемой РНазой Н, которая специфически расщепляет РНК в РНК—ДНК-гибриде, синтезирующемся при действии этой полимеразы. РНК-зависимая ДНК-полимераза обнаружена также в экстрактах из тканей животных, у которых не показано наличие РНК-содержащих онкогенных вирусов. Эти ферменты можно отличить от α -, β - и митохондриальной ДНК-полимераз по их способности использовать синтетические полирибонуклеотиды в качестве матрицы; клеточные ДНК-полимеразы отличаются от обратных транскриптаз также тем, что они не могут использовать природные РНК в качестве матриц и не обладают ассоциированной активностью РНазы Н.

25.3.2.3. Мультиферментные компоненты репликации ДНК

Полимеризация нуклеотидов всеми известными ДНК-полимеразам идет только в направлении от 5' к 3' и абсолютно нуждается в праймере со свободной 3'-гидроксидной концевой группой, к которому и присоединяются полимеризуемые нуклеотиды. Для того чтобы полностью объяснить полуконсервативную репликацию молекулы ДНК, необходимо ответить на следующие вопросы: 1) Каким образом одновременно синтезируются две нити двухнитевого дуплекса ДНК, имеющие противоположную химическую полярность (3'→5' для одной цепи и 5'→3' для другой)? 2) С помощью какого механизма иницируется новая цепь ДНК? Хотя

эти проблемы еще не решены полностью, но о них уже имеется значительная информация.

Заключения о сложности процесса репликации были получены при генетическом анализе репликации ДНК у *E. coli*. Эти исследования привели к обнаружению класса условно-летальных мутантов, у которых нормальная репликация ДНК и, следовательно, рост возможны при 30 °C и невозможны при 42 °C. Основываясь на данных генетического картирования (см. выше), эти температурочувствительные мутанты были отнесены к шести отдельным локусам хромосомы *E. coli*, обозначенным *dnaA*, *dnaB*, *dnaC*, *dnaE*, *dnaG* и *dnaZ*. Продукт гена *dnaE* был идентифицирован как ДНК-полимераза III. Хотя продукты остальных генов неизвестны, предполагается, что продукты генов *dnaA* и *dnaC* участвуют в инициации репликации хромосом, а остальных генов — в удлинении цепи.

Другие белки, кроме тех, которые определяются *dna*-генами, также, вероятно, необходимы для репликации ДНК. Одним из них является ДНК-связывающий белок, который прочно и специфично связывается с однонитевой ДНК, но слабо или вообще не связывается с двунитевой ДНК. Так как временное плавление участков двуспиральной ДНК происходит и при физиологической температуре, особенно на участках, обогащенных тиминном и аденином (гл. 7), то этот белок может связываться с такими временно однонитевыми участками в составе дуплекса, смещая положение равновесия между одно- и двуспиральными состояниями. В результате этого может произойти локальное разделение двух нитей при температуре значительно ниже температуры плавления. Можно предполагать, что этот белок может облегчить раскручивание двойной спирали впереди репликационной вилки (см., например, рис. 25.2). Кроме того, обнаружены ферменты, катализирующие раскручивание двуспиральных молекул ДНК, сопряженное с гидролизом АТФ до АДФ и Р_i. ДНК-гираза *E. coli* (разд. 25.3.1) специфически ингибируется антибиотиком *новобиоцином*, который, как известно, ингибирует репликацию ДНК. Таким образом, функционирование этого фермента играет важную роль при репликации хромосом организма.

Исследование клеток, к которым во время роста на очень короткое время (от 5 до 30 с) добавлен радиоактивный тимидин, показало, что вновь синтезированная ДНК *E. coli* находится в виде коротких фрагментов длиной от 1000 до 2000 нуклеотидов. Эти короткие цепи ДНК затем включаются в основную реплицирующуюся молекулу ДНК с помощью соединяющего фермента — ДНК-лигазы. У мутантов, дефектных по ДНК-лигазе или ДНК-полимеразе I, эти фрагменты могут составлять основную часть вновь реплицированной ДНК. Роль ДНК-полимеразы I в этом процессе обсуждается ниже. Так как короткие вновь возникающие фрагмен-

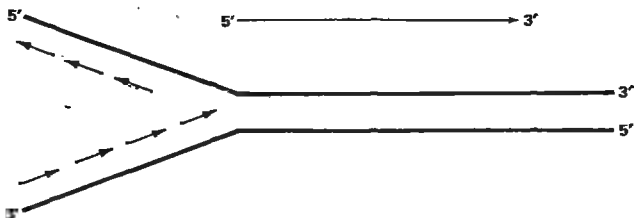


Рис. 25.7. Прерывистая репликация ДНК. Следует подчеркнуть, что так как репликация должна идти в направлении от 5' к 3' для обеих нитей, то полимеризация не может идти одновременно на обеих нитях. В результате этого в районе репликационной вилки должны существовать временные одонитевые участки.

ты ДНК синтезируются в направлении $5' \rightarrow 3'$ (в направлении $3' \rightarrow 5'$ относительно матрицы) (рис. 25.7), прерывистый способ репликации может объяснить одновременную репликацию в направлении от 5' к 3' обеих нитей дуплекса ДНК. Следует отметить, что, согласно этой модели, только запаздывающая нить, которая формально реплицируется в направлении от 3' к 5', должна реплицироваться прерывисто; ведущая нить может реплицироваться непрерывно.

Синтез фосфодиэфирной связи, катализируемый ДНК-лигазой, идет по механизму, отличающемуся от того, который характерен для ДНК-полимеразы. Синтез происходит между соседними 5'-фосфатной и 3'-гидроксидной группами в двухспиральной ДНК, сопряженно с расщеплением пиррофосфатной связи в NAD^+ (*E. coli* и другие прокариоты) или у АТР (эукариоты) в три последовательные стадии: 1) перенос аденильной группы от NAD или АТР на ϵ -аминогруппу лизинового остатка фермента с образованием ковалентного промежуточного фермент-аденилатного комплекса с фосфоамидной связью, что сопровождается выделением никотинамидмононуклеотида или PP_i ; 2) активация 5'-фосфорильного конца ДНК путем переноса аденильной группы с фермента и образование пиррофосфатного производного — ДНК-аденилата; 3) образование фосфодиэфирной связи путем атаки 3'-гидроксидного конца ДНК по активированной 5'-фосфатной группе с выделением AMP , (рис. 25.8).

Хотя прерывистый способ репликации ДНК может объяснить одновременное считывание в направлении $5' \rightarrow 3'$ обеих нитей дуплекса ДНК, он оставляет без ответа вопрос о механизме инициации. Соображение о том, как это может происходить, появилось при изучении репликации мелкого бактериального вируса М13. Этот и родственные бактериофаги содержат одну кольцевую молекулу одонитевой ДНК, состоящую из примерно 5500 нуклеотидов. На начальной фазе репликации эта ДНК превращается в замкнутую кольцевую двунитевую молекулу (гл. 28).

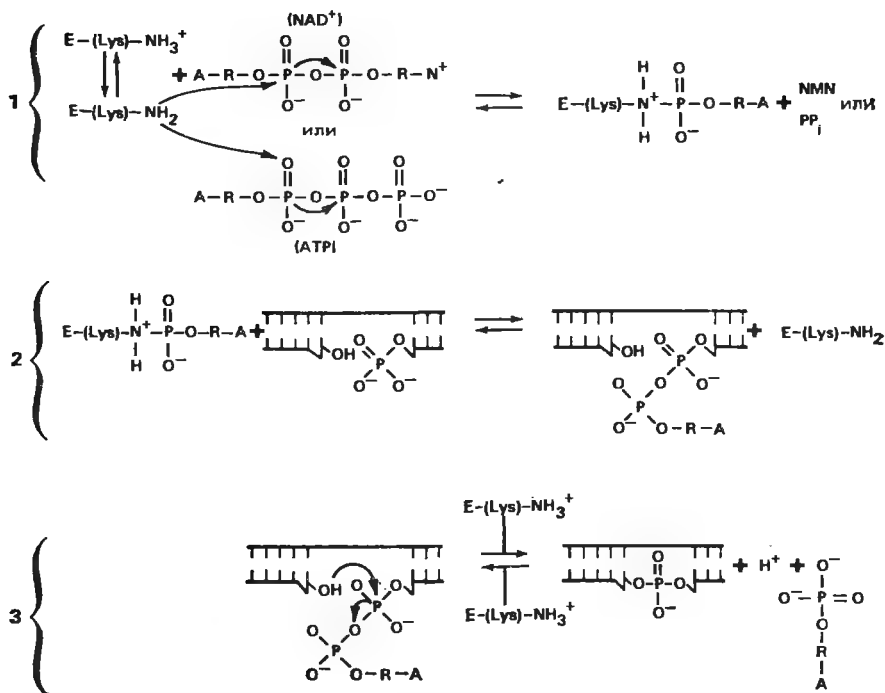


Рис. 25.8. Механизм ДНК-лигазной реакции. NMN — никотинамидмононуклеотид (Kornberg A., Science, 163, 1410, 1969. Copyright 1969 by The American Association for the Advancement of Science).

То, что этот процесс ингибируется *рифампицином*, антибиотиком, ингибирующим РНК-полимеразу, которая способна иницировать полирибонуклеотидную цепь (гл. 26), дает основание предполагать, что праймер для репликации ДНК может образовываться в результате транскрипции. Дальнейшее исследование этого явления *in vivo* и *in vitro* показало, что так оно и есть. Так, после инфицирования *E. coli* фагом M13 РНК-полимераза бактерии катализирует синтез короткого фрагмента РНК на специфическом участке фаговой ДНК. Этот фрагмент РНК служит праймером для синтеза ДНК, катализируемого комплексом из ДНК-полимеразы III и некоторых дополнительных белков. Для этого процесса необходимы АТФ и белки, специфически связывающиеся с одонитевыми ДНК. Удаление инициаторной РНК и заполнение пробела, образующегося при этом, осуществляется путем ник-трансляции, катализируемой ДНК-полимеразой I (разд. 25.3.2.1). Ковалентно замкнутая кольцевая двухнитевая ДНК образуется при действии ДНК-лигазы (рис. 25.9).

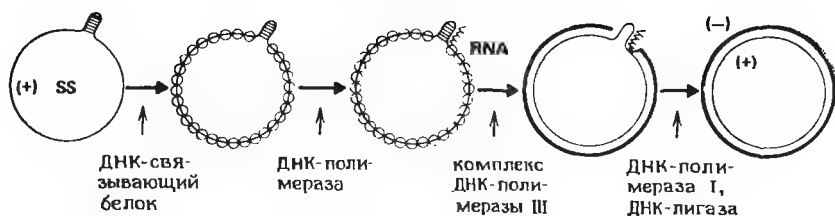


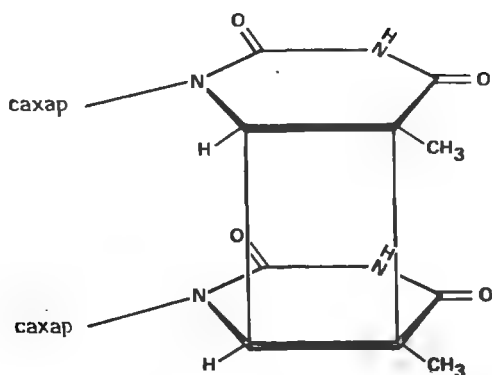
Рис. 25.9. Схема превращения однонитевой ДНК фага M13 в двухнитевую ДНК при действии репликационных белков *E. coli*. Показана двухнитевая шпилька в том месте, где начинается синтез РНК, по аналогии с промоторами транскрипции дзуспиральной ДНК (гл. 26). Детали см. в тексте (Schenman R., Weinera A., Kornberg A., Science, 186, 987, 1974).

Анализ репликации *in vitro* однонитевой кольцевой ДНК из другого бактериофага ϕ X174, которая является более сложным процессом, чем репликация ДНК фага M13, и не ингибируется рифампицином, показал необходимость дополнительных ферментов и факторов, которые могут также принимать участие в репликации хромосомы *E. coli*.

В дополнение к ферментам, необходимым для репликации M13, в этом случае нужны также продукты генов *dnaB*, *C*, *G* и некоторые из них были получены в гомогенном (физически) состоянии как и другие белки, гены которых еще не картированы. Как было отмечено выше, продуктом гена *dnaE* является ДНК-полимераза III. Продуктом гена *dnaG* является, по-видимому, РНК-полимераза, устойчивая к рифампицину, которая синтезирует фрагмент РНК, необходимый для инициации репликации ДНК фага ϕ X174. Так как репликация ДНК у *E. coli* нечувствительна к рифампицину, то продукт гена *dnaG* может быть ферментом, ответственным за синтез фрагмента РНК, необходимого для синтеза растущих фрагментов ДНК.

Правдоподобная, хотя не вполне подтвержденная еще модель репликации ДНК *E. coli*, которая может быть распространена и на другие, более сложные организмы, была построена на основе упомянутых выше исследований. Согласно этой модели, репликация ДНК идет путем локального прерывистого синтеза фрагментов ДНК. Инициация этих фрагментов осуществляется синтезом коротких фрагментов РНК, что катализируется *dnaG* РНК-полимеразой. Удлинение цепи катализируется комплексом ДНК-полимеразы III. Удаление инициаторной РНК и заполнение образовавшегося пробела осуществляются ДНК-полимеразой I, одной или совместно с РНазой H, что позволяет образовавшимся фрагментам ДНК объединяться в реплицирующуюся хромосому с помощью ДНК-лигазы, чем и заканчивается весь процесс. До сих

Рис. 25.10. Структура тиминового димера. Соседние тимидиновые основания в цепи ДНК конденсируются с образованием циклобутанового кольца.



пор неизвестно, только запаздывающая нить или обе нити дуплекса ДНК реплицируются прерывисто.

До сих пор нет информации о функциях остальных *dna*-генов в этом процессе и о роли факторов, которые контролируют образование репликационной вилки в уникальной точке хромосомы и, следовательно, включение цикла репликации ДНК.

25.3.3. Репарация повреждений ДНК

Повреждения ДНК, вызванные химическими и физическими воздействиями, могут быть репарированы с помощью ряда механизмов. Наиболее изучены механизмы репарации повреждений, вызванных ультрафиолетовым облучением ДНК. При действии ультрафиолетового излучения на ДНК образуются тиминовые димеры в результате конденсации двух соседних тиминовых остатков с образованием циклобутанового кольца (рис. 25.10). Образование тиминового димера вызывает нарушение геометрии спирали, препятствует репликации, и поэтому он должен быть удален из ДНК. Предполагается, что у *E. coli* это осуществляется преимущественно с помощью «темнового» процесса выщепления, который идет в три стадии (рис. 25.11): 1) расщепление нити ДНК непосредственно возле или вблизи от димера специфической эндонуклеазой; 2) одновременное выщепление олигонуклеотида, содержащего тиминовый димер, и заполнение бреши включением нуклеотидов, что осуществляется 5'→3'-экзонуклеазной и полимеразной функциями ДНК-полимеразы I. Это процесс ник-трансляции (перемещения разрыва). У других организмов выщепление и репаративная репликация могут катализироваться отдельными полимеразми и экзонуклеазами; 3) образование фосфодиэфирной связи между вновь синтезированным фрагментом и остальной ДНК, катализируемое ДНК-лигазой.

Так как известны жизнеспособные мутанты *E. coli*, у которых делстирован ген, кодирующий специфическую эндонуклеазу, то должны быть и другие механизмы для репарации ультрафиолет-индуцированных повреждений ДНК. Один из путей включает действие фотореактивирующего фермента, который, вероятно, специфически связывается с пиримидиновым (тиминовым) димером. Поглощение видимого света хромофором, который ассоциирован с ферментом, предоставляет необходимую для расщепления циклобутанового кольца энергию, причем регенерируются два соседних тиминовых ядра. Фотореактивирующий фермент был обнаружен в самых разных клетках, таких, как микоплазма, *E. coli* и лейкоциты человека.

Некоторые редкие наследственные заболевания человека связаны с дефектами в эксцизионной репарации. К ним относятся пигментная ксеродерма, анемия Фанкони, синдром Блума и преждевременное старение. Больные ксеродермой ненормально чувстви-

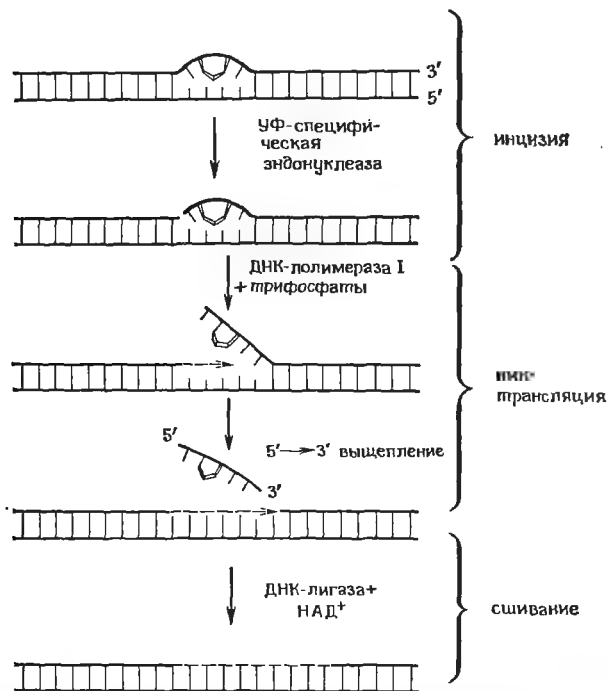


Рис. 25.11. «Темновая» репарация ДНК, содержащей тиминовые димеры. Обратите внимание на процесс ник-трансляции (перемещение бреши), который катализируется ДНК-полимеразой (Kelly R. B., Atkinson M. R., Huberman J. A., Kornberg A., 224, 491, 1969).

тельны к солнечному свету, и у них часто возникает рак кожи. Если культивированные клетки кожи этих больных подвергнуть ультрафиолетовому облучению, то скорость выщепления димеров тимина этих клеток будет существенно меньше, чем у клеток кожи нормальных людей. По крайней мере у одного класса больных, страдающих этим заболеванием, неспособность выщепления тиминовых димеров обусловлена дефектом эндонуклеазы, которая расщепляет двуспиральную ДНК непосредственно возле или вблизи от димера. У другого класса дефектна последняя стадия процесса репарации — образование фосфодиэфирной связи между вновь синтезированным фрагментом и остальной ДНК (сшивание лигазой).

Другая система репарации выщепляет урацил из ДНК. Дефект дезоксиуридинтрифосфатфосфогидролазы (гл. 24) приводит к увеличению внутриклеточного пула dUTP, что может сопровождаться включением урацила в ДНК. Урацил может возникнуть также при дезаминировании цитозиновых остатков. Были обнаружены N-гликозидаза, которая гидролизует связь между урацилом и дезоксирибозой в ДНК, а также нуклеазы, которые гидролизуют фосфодиэфирную связь около того места, где выщеплено основание*. ДНК-полимераза I может завершить процесс репарации такого рода, как и в случае эксцизионной репарации ультрафиолет-индуцированных димеров тимина.

25.3.4. Модификация и рестрикция ДНК

Как было описано в гл. 7, ДНК может содержать метилированные и модифицированные иным образом основания. Одним из первых оснований такого рода, обнаруженных в ДНК, был 5-оксиметилцитозин, который замещает цитозин в ДНК бактериофагов T2, T4 и T6. Оксиметилцитозин модифицируется далее путем глюкозилирования, степень и характер которого специфичны для каждой из этих ДНК (табл. 25.2).

Замещение цитозина глюкозилированным оксиметилцитозином обусловлено рядом ферментов, которые индуцируются в клетках *E. coli* после инфицирования их бактериофагами T2, T4 или T6 (гл. 28). Эти ферменты включают: 1) dCMP-оксиметилазу, которая превращает dCMP в 5-оксиметил-dCMP; это соединение далее может быть превращено в соответствующий дезоксинуклеозидтрифосфат; 2) dCTP-пирофосфатазу, которая расщепляет dCTP

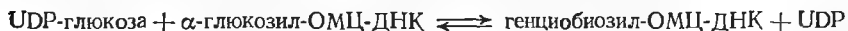
* Недавно обнаружена также гликозидаза, расщепляющая связь между гипоксантином и дезоксирибозой в ДНК. Дезоксиинозиновое звено может образоваться в результате дезаминирования дезоксиаденозинового. Кроме того, обнаружен фермент — инсертаза, который образует связь между свободным гликозидным центром, возникающим в результате ферментативного или химического расщепления N-гликозидной связи, и свободным нуклеиновым основанием. — *Прим. перев.*

Таблица 25.2

Глюкозилирование оксиметилцитозинových остатков в ДНК фагов T2, T4 и T6

	Количество глюкозилированных оксиметилцитозинových остатков, % от общего количества		
	T2	T4	T6
Неглюкозилированный	25	0	25
α -Глюкозил	70	70	3
β -Глюкозил	0	30	0
α -Генциобозил (α -глюкозо- β -глюкозил)	5	0	72

(и dCDP) до dCMP, предотвращая использование dCTP для репликации ДНК и образуя dCMP — субстрат для dCMP-оксиметилазы; 3) серию глюкозилтрансфераз, которые катализируют перенос глюкозильного остатка с уридиндифосфатглюкозы на оксиметилцитозин в составе ДНК.



Модификация ДНК фагов T2, T4 и T6 путем замещения цитозина на глюкозилированный оксиметилцитозин служит для защиты ДНК этих фагов от расщепления их эндонуклеазами, которые быстро и полностью расщепляют хозяйскую ДНК, продукты расщепления которой используются для синтеза фаговой ДНК.

Другой и более общей модификацией ДНК является метилирование N⁶-аминогруппы аденозина (и, гораздо реже, C-5 цитозина) в составе ДНК. Это происходит путем переноса метильной группы с S-аденозилметионина на адениновый или цитозиновый остаток в специфических последовательностях ДНК, что катализируется соответствующей трансметилазой (разд. 21.4.2.10). Метилирование этих последовательностей делает ДНК иммунной по отношению к действию соответствующих рестрикционных нуклеаз, которые производят расщепление обеих нитей ДНК, не имеющей такой модификации. Таким образом, система модификации и рестрикции способна разрушать чужую ДНК, которая может попасть в клетку, но защищает собственную ДНК, сообщая, таким образом, клетке иммунитет по отношению к чужой, например вирусной, нуклеиновой кислоте.

Рестрикционные эндонуклеазы были обнаружены во многих видах бактерий и некоторые из них получены в гомогенном состоянии. Они образуют два класса: *тип I*, которые нуждаются в Mg²⁺,

АТР и S-аденозинметионине для расщепления фосфодиэфирной связи, и *тип II*, которые нуждаются только в Mg^{2+} . Для ферментов первого типа неизвестно, какую роль играют АТР и S-аденозилметионин, и не идентифицированы продукты расщепления ДНК. Гораздо больше известно о рестрикционных ферментах типа II. Более чем для 50 ферментов этого типа определена последовательность модифицируемых и расщепляемых участков ДНК; некоторые примеры приведены в табл. 25.3. Важное обобщение,

Таблица 25.3
Участки узнавания некоторыми ферментами рестрикции^a

Фермент	Последовательность на рестриктируемом участке
<i>EcoRI</i>	$ \begin{array}{c} \downarrow \\ 5'-G-A^*-A-T-T-C- \\ -C-T-T-A-A^*-G-5' \end{array} $
<i>HindII</i>	$ \begin{array}{c} \downarrow \quad \uparrow \\ 5'-G-T-Py-Pu-A^*-C \\ -C-A^*-Pu-Py-T-G-5' \end{array} $
<i>BglII</i>	$ \begin{array}{c} \downarrow \quad \uparrow \\ 5'-A^*-G-A-T-C-T- \\ -T-C-T-A-G-A^*-5' \end{array} $
<i>HaeII</i>	$ \begin{array}{c} \uparrow \quad \downarrow \\ 5'-Pu-G-C-G-C^*-Py- \\ -Py-C^*-G-C-G-Pu-5' \end{array} $

^a Основания, модифицированные специфическими метилазами, отмечены звездочками. А* обозначает N⁶-метиладенин, а С* — 5-метилцитозин. Система номенклатуры рестрикционных ферментов приведена в работе: Smith H., Natans D., J. Mol. Biol., 81 491(1973). Так, *EcoRI* — это фермент из *E. coli*, обладающей фактором резистентности I; *HindII* — фермент *Haemophilus influenzae* R₄; *BglII* — фермент *Bacillus globiggi*; *HaeII* — фермент *Haemophilus aegyptius*. Стрелки показывают точки расщепления цепи.

сделанное при анализе полученных результатов, заключается в том, что участки расщепления симметричны. Они обладают осью симметрии второго порядка, которая перпендикулярна оси спирали ДНК. В ряде случаев места расщепления на обеих цепях не совпадают и образующиеся продукты обладают перекрывающимися 3'-гидроксидными и 5'-фосфатными концами. Так как по крайней мере один из ферментов, *EcoRI*-эндонуклеаза, состоит из двух одинаковых субъединиц, симметрия второго порядка при расщеплении может отражать симметричное расположение субъединиц.

Благодаря способности расщеплять немодифицированную ДНК с высокой специфичностью рестрикционные нуклеазы стали ценными реагентами для определения первичной структуры ДНК. Они

используются также для генетического картирования вирусных хромосом (гл. 28). Использование рестрикционных нуклеаз для конструирования и клонирования гибридных молекул ДНК описано в разд. 25.4.1.

В дополнение к высокоспецифичным системам модификации и рестрикции, описанным выше, имеются трансметилазы, которые катализируют метилирование S-аденозилметионином адениновых и цитозиновых оснований ДНК с образованием 6-метиламинопурина и 5-метилцитозина в гораздо большем количестве, чем при действии системы модификации — рестрикции; эти две системы относительно независимы, и их функции неизвестны.

25.3.5. Структура хромосом эукариот

В отличие от прокариот эукариоты имеют больше чем одну хромосому. Однако целый ряд данных свидетельствует о том, что каждая хромосома содержит единственную молекулу ДНК. Авто-радиографический анализ хромосом растений и млекопитающих, меченных тритированным тимидином и затем претерпевших деление на протяжении нескольких поколений, показывает, что меченая молекула сохраняется в виде целой цепи. Вискозиметрические данные свидетельствуют о том, что размер наибольших молекул ДНК из *D. melanogaster* соизмерим с количеством ДНК в самой большой хромосоме. Анализ скорости седimentации и электронная микроскопия хромосом дрожжей также обнаруживают интактные молекулы ДНК такого размера, которые и ожидалось для хромосом этих организмов, если принять, что в состав каждой хромосомы входит единственная молекула ДНК. Следовательно, молекула ДНК длиной 1 см должна быть упакована в хромосому длиной 1 нм. Такая тесная упаковка обеспечивается, в частности, благодаря ассоциации с гистонами, что приводит к образованию хроматина (гл. 7). Были обнаружены и другие, кроме гистонов, белки, ассоциированные с ДНК в хромосомах. Эти негистоновые хромосомные белки исключительно разнообразны по свойствам, и нет сомнений, что они играют важную структурную, ферментативную и регуляторную роль в хроматиновом комплексе.

Анализ очищенного хроматина свидетельствует о том, что он содержит равные весовые количества гистонов и ДНК и равное количество основных аминокислот и фосфатных групп ДНК. Таким образом, ДНК-гистоновое взаимодействие, скорее всего, стабилизируется за счет взаимодействия зарядов.

В хроматине обнаружено пять типов гистонов, обозначенных H1, H2A, H2B, H3 и H4 (гл. 7). Они присутствуют примерно в эквимолярном соотношении, за исключением H1, которого содержится в два раза меньше, чем каждого из остальных. Кроме взаимодействия с ДНК гистоны могут ассоциировать друг с другом. Так, гистоны H3 и H4 могут существовать в растворе в виде тетра-

мера типа $(H3)_2(H4)_2$, а гистоны H2A и H2B могут давать полимер типа $(H2A-H2B)_n$.

Рентгеноструктурный анализ ядер и выделенного хроматина показывает, что гистоны и ДНК расположены в виде структуры с периодом повторения 110 Å. Если хроматиновые нити расщепить с помощью микрококковой нуклеазы (гл. 7), образуется серия дискретных фрагментов, которые представляют собой наборы повторяющихся блоков размеров примерно 200 пар оснований. Под электронным микроскопом хроматин представляет собой цепь бусин на нитке. Эти бусины, называемые *ню-телами* или *нуклеосомами*, имеют диаметр примерно 110 Å, M 200 000 и содержат по две молекулы гистонов H2A, H2B, H3 и H4; размер нуклеосомы соответствует повторяющемуся фрагменту ДНК длиной примерно в 200 пар оснований. Модель структуры хроматина, построенная на основе этих и аналогичных исследований, состоит из повторяющихся единиц, построенных из основных частиц, содержащих 140 пар оснований, разделенных блоками по 40 пар оснований. Гистоны H2A, H2B, H3 и H4 входят в состав этих частиц, а гистон H1 заключается в разделяющих секторах. Таким способом фрагменты ДНК, содержащие примерно 200 пар оснований и имеющие длины 700 Å, могут быть сконденсированы в структуру диаметром 110 Å.

Хотя детали этих структур неизвестны, но электронно-микроскопический анализ и исследование малоуглового рассеивания нейтронов нуклеосомами свидетельствуют о том, что ДНК расположена на поверхности этих частиц с радиусом вращения 50 Å, а гистоны — внутри с радиусом вращения 30 Å.

Очевидно, что гистоны играют важную роль в упаковке ДНК у эукариотных хромосом и могут служить для регуляции генетической активности. Так, с помощью гибридизационного теста (разд. 25.3.6) было показано, что мРНК, синтезированная *in vitro* РНК-полимеразой на выделенном хроматине в качестве матрицы, представляет только небольшую часть генов, существующих в геноме. Кроме того, РНК, синтезированная в этих условиях, почти идентична РНК, выделенной из клетки. Ограниченная способность хроматина к транскрипции является следствием ассоциации ДНК с гистонами, так как удаление белка любым способом приводит к увеличению матричной активности.

Хотя аминокислотная последовательность гистонов необычайно консервативна, гистоны могут быть сильно модифицированы. Среди модифицированных аминокислот были обнаружены моно-, ди- и три- ϵ -N-метиллизин, ω -N-метиларгинин, 3-метилгистидин, α -N-ацетилсерин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, O-фосфотреонин, N-фосфоглизин и N³-фосфогистидин. Модификация гистонов идет по специфическим участкам каждого гистона и происходит только в определенные моменты клеточного цикла. Функции спе-

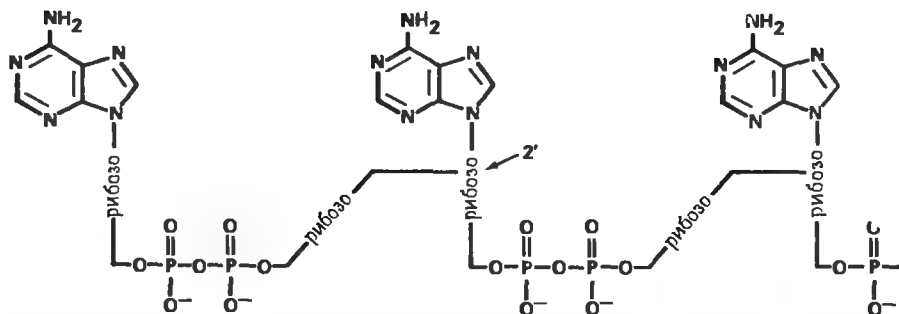


Рис. 25.12. Структура ADP-рибозы (Nishisaka Y., Ueda K., Yoshichara K., Yamamura H., Takeda M., Hayashi O., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34, 781, 1969).

цифического характера модификации неизвестны; однако это, вероятно, влияет на взаимодействие гистонов с ДНК и может таким образом модулировать активность генов.

Кроме метилирования и фосфорилирования гистоны могут подвергаться полиаденозиндифосфатрибозилированию (поли-ADP-рибозилирование). Соответствующий фермент, который находится в ассоциированном с хроматином состоянии, катализирует перенос ADP-рибозного остатка с NAD на гистон H1 и, возможно, другие хроматиновые белки с образованием полимера длиной до 50 остатков.



Полимер построен из повторяющихся остатков ADP-рибозы, в которых межнуклеотидная связь образована между С-1 одного и С-2 соседних рибозных остатков. Возможная структура поли-ADP-рибозы дана на рис. 25.12.

25.3.6. Повторяющиеся последовательности в ДНК эукариот

У прокариот практически все последовательности нуклеотидов содержатся в хромосоме в одной копии на гаплоидный геном, т. е. они не повторяются. В противоположность этому определенные последовательности у эукариот могут быть повторены многократно. Повторяющаяся часть генома может изменяться при переходе от одного организма к другому; однако эта часть обычно значительна и может составлять более чем половину генома. Принципиальное различие между прокариотическими и эукариотическими геномами можно легко обнаружить, изучая кинетику реассоциации ДНК из двух источников (рис. 7.6). Если ДНК прокариота фраг-

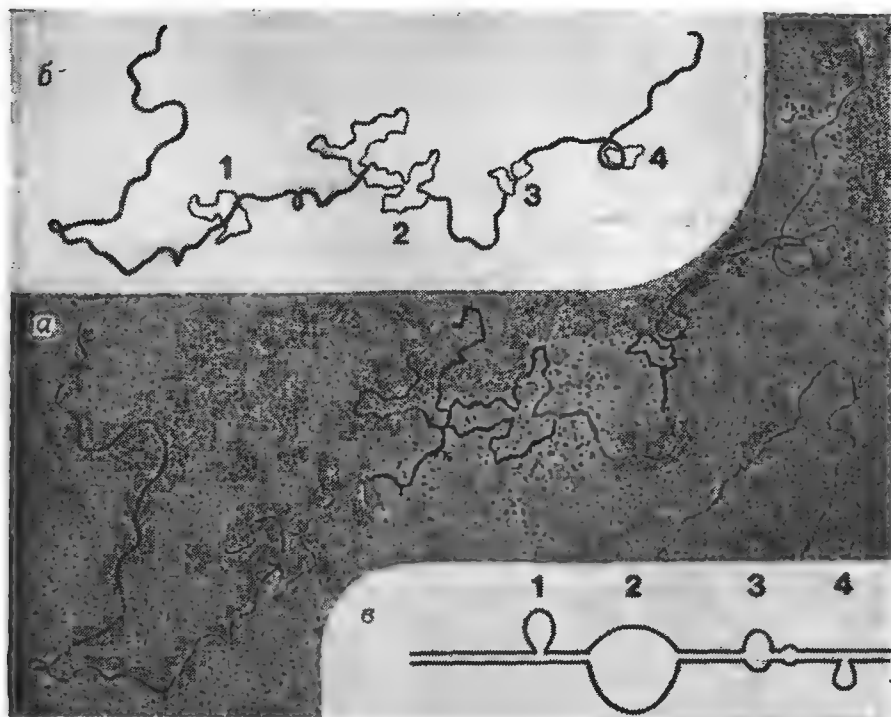


Рис. 25.13. Визуализация гетеродуплексной структуры, образованной одной цепью ДНК фага дикого типа и комплементарной цепью фага, имеющего делецию. *а* — электронная микрофотография; *б* — схема гетеродуплексной молекулы, показывающая делеционную петлю; *в* — схема гетеродуплексной молекулы (Courtesy of Dr. Davis).

ментировать до небольших фрагментов длиной менее 500 пар оснований, денатурировать их и образовавшиеся одонитевые фрагменты реассоциировать с образованием двунитевых молекул, то кинетика реассоциации подчиняется единому уравнению реакции второго порядка, свидетельствуя о том, что практически все последовательности прокариотного генома представлены единственными копиями.

Пример точности реассоциации дает изучение реакции между нитью ДНК фага λ дикого типа и комплементарной нитью из мутанта, у которого делетирован фрагмент ДНК. Гетеродуплекс, образуемый этими нитями, должен иметь одонитевую петлю, содержащую тот участок ДНК фага дикого типа, который отсутствует в делеционном мутанте. Такой гетеродуплексный участок можно легко обнаружить под электронным микроскопом (рис. 25.13). Раз-

мер делеции и ее положение можно определить, измерив относительные контурные длины. Действительно, варианты такого гетеродуплексного картирования доведены до совершенства — можно картировать даже мутации, обусловленные изменением одиночной пары оснований.

Кинетика реассоциации эукариотных ДНК более сложна, так как эта ДНК содержит повторяющиеся и неповторяющиеся последовательности (рис. 25.14).

Многokrатноповторяющиеся последовательности, которые хорошо видны на графике реассоциации, можно физически отделить от остальной ДНК с помощью изопикнического центрифугирования в градиенте C_3Cl (гл. 7). Этого легче всего можно достигнуть, расщепив ДНК с помощью гидродинамического сдвига на двуниевые фрагменты длиной в 10 000—60 000 пар оснований перед центрифугированием. В этих условиях ДНК распределяется в основной полосе и в наборе меньших полос, называемых *сателлитными полосами* (рис. 25.15).

У человека обнаружены четыре сателлитные ДНК, которые составляют 6% хромосомной ДНК, или 174 000 000 пар оснований на геном. Преобладающие сателлитные ДНК обычно имеют очень простую многократно повторяющуюся последовательность. Например, сателлитная ДНК с плавучей плотностью $1,672 \text{ г/см}^3$

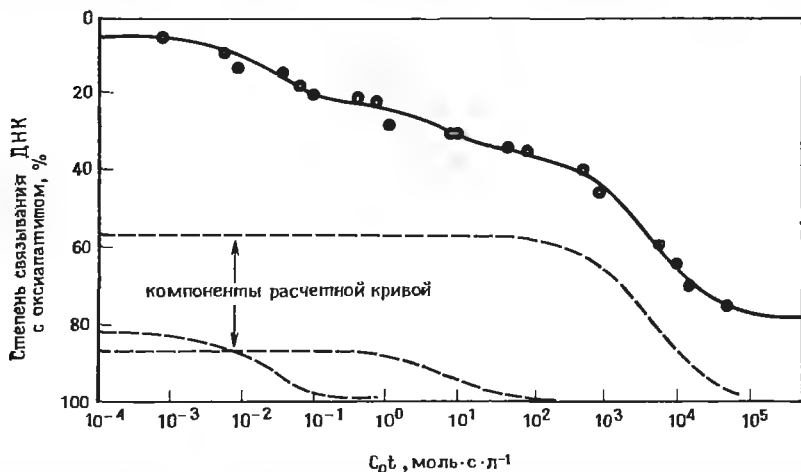


Рис. 25.14. Кинетика реассоциации ДНК человека. Реассоциацию измеряют по степени связывания с оксипатитом; однониевая ДНК прочно связывается с оксипатитом в отличие от двухниевой ДНК, которая не связывается. Кривые отражают наличие трех типов последовательностей: высокоповторяющиеся, умеренноповторяющиеся и неповторяющиеся (Arrighi F. E., Saunders G. F., p. 113, in R. F. Rfeifer ed., «Modern Aspects of Cytogenetics: Heterochromatin in Man», F. K. Shattauer Verlag, Stuttgart, 1972).

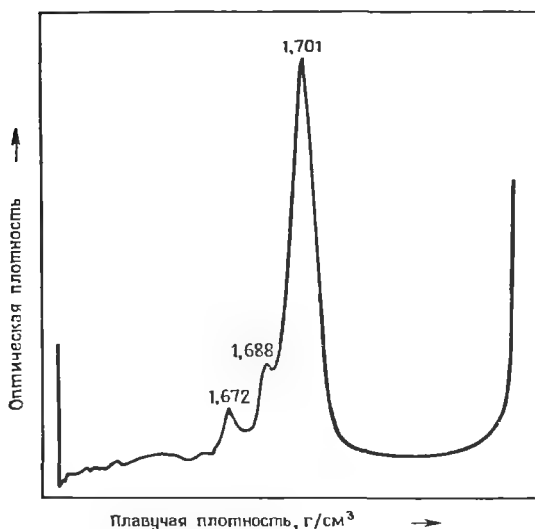


Рис. 25.15. Отделение сателлитных ДНК от основной массы ДНК *Drosophila melanogaster* центрифугированием в градиенте плотности CsCl. Пик 1,701 — основная полоса ДНК; пики 1,672 и 1,688 — две сателлитные ДНК (Peacock A. J., Brutlag D., Goldring E., Appels R., Hinton C. W., Lindsley D. J., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 405, 1973).

(рис. 25.15), имеет приведенную ниже последовательность, повторенную 12×10^6 раз.

-A C A A A C T-

-T G T T T G A-

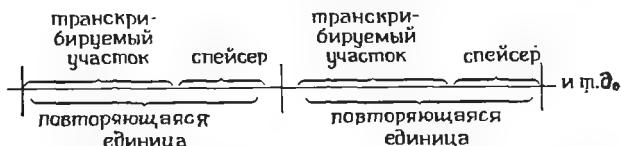
Функция сателлитных ДНК до сих пор неизвестна. Они обнаруживаются обычно в центромерных участках хромосом и могут участвовать в спаривании и сегрегации хромосом.

У многих эукариот большая часть умеренноповторяющихся последовательностей перемежается неповторяющимися последовательностями, но иногда они расположены тандемно. Так, в хромосоме *X. laevis* короткие повторяющиеся последовательности длиной 300 пар оснований перемежаются неповторяющимися последовательностями длиной примерно 1000 пар оснований. Функция перемежающихся умеренноповторяющихся последовательностей неизвестна, но предполагается, что они играют некоторую регуляторную роль в выражении генов (см. ниже).

Хотя большая часть умеренноповторяющихся последовательностей перемежается неповторяющимися последовательностями, некоторые умеренноповторяющиеся последовательности расположены тандемно. Примеры такого тандемного расположения описаны в следующих разделах.

25.3.6.1. Гены 18S и 28S рибосомных РНК

Повторяющейся единицей в этом расположении является участок, который при транскрипции дает единую цепь РНК (транскрипт). Транскрипт подвергается «созреванию», т. е. расщеплению специфическими нуклеазами с образованием 18S и 28S рибосомных РНК, а также спейсерный участок ДНК, который не транскрибируется и функции его неизвестны.



Эукариотный геном содержит обычно несколько сотен повторяющихся единиц; они локализованы в области хромосомы, которая образует ядрышко и называется *ядрышковым организатором*.

25.3.6.2. Гены 5S рибосомной РНК

5S РНК транскрибируется не с того гена, который кодирует 18S и 28S рибосомные РНК. В гаплоидном геноме *X. laevis* содержится примерно $2,5 \cdot 10^4$ копий этого маленького гена. Хотя эти гены расположены во многих местах различных хромосом, каждый участок содержит много копий, расположенных тандемно и разделенных спейсером, как и гены 18S и 28S рибосомных РНК.

25.3.6.3. Гены транспортных РНК

Каждый ген транспортной РНК у *X. laevis* расположен тандемно и также перемежается спейсером.

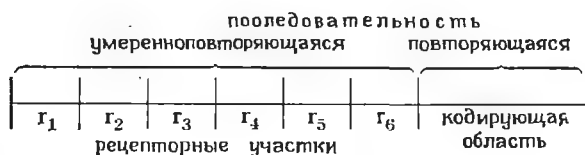
25.3.6.4. Гены для синтеза гистонов

В ядрах некоторых видов морских ежей каждый гистоновый ген повторен почти 1000 раз. У этих животных предполагается, что по крайней мере четыре гистоновых гена тесно сцеплены друг с другом и такая группа вместе со спейсерной ДНК, положение которой относительно четырех генов неизвестно, образует тандемно повторяющуюся единицу.

25.3.7. Значение умеренноповторяющихся последовательностей

Анализ прокариотных хромосом показывает, что почти вся ДНК в хромосоме служит для кодирования белков. Для эукариот

это не так, у них только неповторяющиеся и немногие умеренно-повторяющиеся последовательности транскрибируются и транслируются. Правдоподобной, но еще непроверенной моделью для объяснения роли умеренноповторяющихся последовательностей, в частности тех, которые расположены между неповторяющимися последовательностями, является предположение, что они представляют собой участки для связывания регуляторных молекул (РНК или белка). Основанием для построения такой модели послужило то, что у различных типов клеток в сложном организме должны активироваться различные комбинации генов и определенный ген может работать в различных комбинациях. Если каждая комбинация контролируется одной или более регуляторных молекул, то соответствующий ген должен быть способен отвечать более чем на один регулятор. Следовательно, кодирующие гены должны быть ассоциированы, например, с набором рецепторных участков, что иллюстрируется следующей диаграммой:



25.4. Манипуляции генетическими элементами

25.4.1. Выделение генов клонированием рекомбинантных молекул ДНК, сконструированных *in vitro*

Фрагменты ДНК из бактериальной хромосомы могут быть включены в ДНК бактериофага путем генетической рекомбинации *in vivo* (разд. 25.9.1). Таким образом может быть получена гомогенная популяция ДНК для изучения бактериальных генов. Гомогенность является следствием того, что все молекулы в популяции являются прямыми потомками единственной молекулы ДНК, т. е. ДНК подверглась клонированию. Недавно стало возможным включать *in vitro* фрагменты ДНК любого происхождения в ДНК бактериофагов или различных бактериальных *плазмид*. Последние являются небольшими кольцевыми ДНК (5000—10 000 пар оснований), которые могут реплицироваться автономно в бактериальной клетке. Образующуюся при этом гибридную молекулу ДНК можно затем клонировать *in vivo*. Новая методология позволяет выделить индивидуальные фрагменты ДНК (гены) из любого источника в больших количествах и в индивидуальном состоянии.

Было разработано несколько методов для конструирования таких гибридных молекул ДНК. Один из них показан на рис. 25.16,

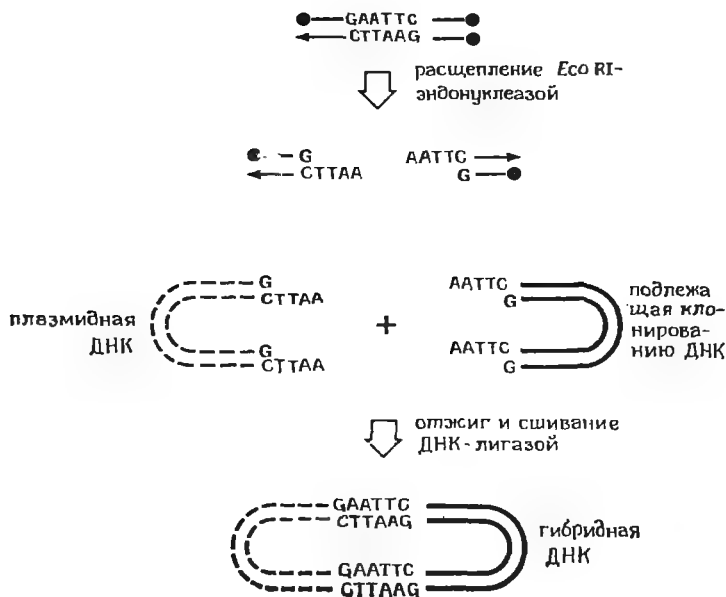
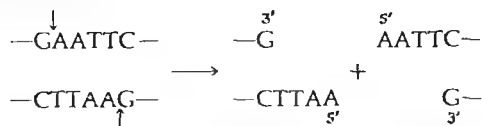


Рис. 25.16. Конструирование *in vitro* гибридной молекулы ДНК. Плазмидную ДНК, содержащую только один участок расщепления рестриктазой, и ДНК, подлежащую клонированию, подвергают действию эндонуклеазы *Eco*RI; расщепленные ДНК отжигают и сшивают лигазой, в результате чего образуется гибридная молекула ДНК.

где саморазмножающейся молекулой ДНК (вектором) является плазмида, которая придает устойчивость к антибиотикку тетрациклину и благодаря этому позволяет проводить фенотипическую селекцию клеток, содержащих эту плазмиду. Кольцевую ДНК плазмиды сначала расщепляют в одном месте с помощью *Eco*RI-эндонуклеазы (табл. 25.3), чтобы образовать концы, которые идентичны и комплементарны:



ДНК, которая должна быть включена в плазмиду, тоже подвергается расщеплению для образования набора аналогичным образом терминированных фрагментов. Эти фрагменты затем отжигают в присутствии расщепленной плазмиды, причем они соединяются за счет комплементарных концов, после чего между ними замыкают ковалентные связи с помощью ДНК-лигазы. Очевидным тре-

бованием к этому методу является то, чтобы включение фрагмента не вызывало инактивации необходимых свойств вектора, т. е. способности к автономной репликации и проявлению селектирующего фенотипа, например устойчивости к тетрациклину.

Метод клонирования был успешно применен к ДНК *X. laevis*, обогащенной генами, кодирующими 18S и 28S рибосомальные РНК, чтобы получить клонированные фрагменты тех tandemных участков, где расположены эти гены (разд. 25.3.6.1).

Как правило, селекция специфических генов, включенных в ДНК, удастся лучше всего в том случае, если ген проявляется в клетке-хозяине *E. coli*. Действительно, гибридные молекулы ДНК, содержащие гены ферментов синтеза триптофана у *E. coli* (гл. 26), были выделены путем селекции в клетках, которые после включения гибридной ДНК в триптофановый ауксотроф уже не нуждались больше в триптофане для роста. Ген из дрожжей, который кодирует один из ферментов биосинтеза гистидина, имидазолглицерофосфат-дегидратазу (гл. 23), был клонирован и выделен аналогичным образом. Этот последний случай свидетельствует о том, что по крайней мере некоторые последовательности эукариотной ДНК могут быть транскрибированы и транслированы в *E. coli* с достаточной точностью для проявления генетического выражения и, следовательно, метод может найти широкое применение при клонировании и проявлении генов млекопитающих в простейших бактериальных клетках.

25.4.2. Синтез генов in vitro

Разработка химических методов синтеза коротких (от 8 до 15 остатков) олигонуклеотидов позволила провести полный синтез гена, кодирующего одну из тирозинспецифичных тРНК *E. coli* (гл. 26). Этот метод, более подробно описанный в следующей главе, применим для синтеза любого гена, последовательность которого известна, и предоставляет другой подход для манипуляции с определенными генетическими элементами.

25.5. Нуклеотидный код и структура белков

Так как ДНК представляет собой линейную комбинацию нуклеотидов, связанных фосфодиэфирной связью, то закодированная в ДНК генетическая информация должна специфически передаваться последовательностью оснований (сахарофосфатный скелет одинаков по всей цепи). Ранее были представлены данные о том, что за синтез ферментов ответственны определенные гены. Аналогичные данные указывают на то, что гены направляют синтез всех белков вне зависимости от их физиологической функции. Нуклеи-

новые кислоты растительных вирусов и бактериофагов проникают в клетку без белка оболочки. Тем не менее вновь образованные вирусные частицы содержат полный комплект белков, а в клетке-хозяине образуются также все вирусспецифические ферменты (гл. 28). Таким образом, вся информация для синтеза специфических белков содержится в нуклеиновой кислоте.

Некоторые люди имеют гемоглобин HbS, который при дезоксигенации гораздо менее растворим, чем нормальный гемоглобин (гл. 31). Эритроциты, содержащие HbS, претерпевают изменение формы, становятся *серповидными*, что объясняется агрегацией дезоксигемоглобина. Способность организма образовывать HbS передается по наследству. HbS отличается от HbA (нормального гемоглобина) одним аминокислотным остатком в β -цепи (гл. 26). Для другого аномального белка также было показано, что он отличается от нормального единственной аминокислотной заменой (гл. 26). Более того, видовые различия многих гомологических белков (гл. 27) заключаются в замещении аминокислотных остатков в определенных положениях пептидной цепи. Таким образом, ген, кодирующий синтез β -цепи, должен определять аминокислотную последовательность белка; мутация, т. е. изменение ДНК, приводит к изменению последовательности в белке.

Гемоглобин человека состоит из α - и β -цепей (рис. 4.2), синтез которых обусловлен генами, локализованными в различных хромосомах. Таким образом, гипотеза — «один ген — один фермент» должна быть переформулирована «один ген — одна полипептидная цепь», так как индивидуальные ферменты и другие белки содержат обычно одну или несколько цепей. *Генетическая* определенность структуры белка связана с последовательным расположением аминокислот в цепи или в цепях. В связи с этим концепцию о последовательности можно теперь сформулировать следующим образом: последовательность аминокислот в белке определяется последовательностью нуклеотидов в соответствующем участке ДНК. Сейчас мы рассмотрим некоторые следствия этой гипотезы.

25.5.1. Специфическая конформация белков

Глобулярные белки проявляют свои характерные свойства только в нативном состоянии; в связи с этим можно задать вопрос, контролируется ли генетически сложная специфическая укладка полипептидной цепи? Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что аминокислотная последовательность как таковая определяет укладку полипептидной цепи с образованием нативной конформации. Это подтверждается тем, что многие высокоочищенные белки могут быть денатурированы, т. е. переведены в беспорядочное состояние, но в подходящих экспериментальных условиях они спонтанно восстанавливают свои нативные свойства (гл. 6).

Примером служит обратимая денатурация гемоглобина, описанная ранее (разд. 6.6). В молекуле гемоглобина нет дисульфидных связей, и пространственная укладка ее обусловлена только нековалентными силами, т. е. гидрофобными силами, водородными связями и ионными взаимодействиями (разд. 6.3 и далее). Подобным образом и молекулы других белков не имеют дисульфидных связей — это миоглобин, эналазы, различные амилазы и цитохром *c*. В каждом случае возврат из беспорядочного состояния к нативному требует перестройки сотен специфических связей на молекулу.

Наиболее убедительной иллюстрацией до настоящего времени является поведение рибонуклеазы, которая содержит четыре внутрицепочечные дисульфидные связи (разд. 9.3.2). При восстановлении этих связей образуются восемь сульфгидрильных групп и беспорядочно свернутая полипептидная цепь. Реокисление в мягких условиях переводит фермент в нативное состояние, т. е. реализуется одна из 256 возможных комбинаций восстановления дисульфидных связей. В этом случае определенная специфическая аминокислотная последовательность обуславливает определенное пространственное расположение соответствующих пар сульфгидрильных групп перед окислением, и при этом сложенная полипептидная цепь находится в наиболее термодинамически стабильном состоянии. Таким образом, *генетическое* влияние на конформацию выражается в определении положения тех остатков, которые критичны для образования соответствующей конформации и, следовательно, для функциональных свойств белка.

Молекулы многих белков состоят из двух и более цепей. У некоторых из них цепи объединены за счет нековалентных сил, например в гемоглобине (гл. 31), альдолазе (гл. 14), глутаматдегидрогеназе (гл. 6) и т. д. В этих случаях диссоциация и ассоциация легко обратимы при воздействии тех же факторов окружающей среды, которые контролируют конформацию отдельных полипептидных цепей. Таким образом, для образования многоцепочечных белков нет специальных генетических факторов; их образование является следствием генетической информации, выраженной в аминокислотной последовательности полипептидных цепей, входящих в состав белка.

У некоторых многоцепочечных белков, таких, как инсулин, химотрипсин и плазмин, цепи связаны дисульфидными мостиками. Однако в этих и других случаях неактивный белок-предшественник синтезируется в виде единой цепи; затем образуются дисульфидные связи, как это было описано выше для РНазы. Образование многоцепочечных активных форм является результатом протеолитического расщепления с утратой фрагмента исходной полипептидной цепи, а оставшиеся пептидные цепи оказываются скрепленными дисульфидными связями. Это было описано раньше для химотрипсина (рис. 8.14), но справедливо также и для превраще-

ния плазминогена в плазмин (гл. 29) и проинсулина в инсулин (гл. 46).

Так как укладка и самосборка сложных глобулярных белков идут благодаря генетически детерминированной аминокислотной последовательности, то очевидно, что это применимо и к более сложным агрегатам, таким, как некоторые ферменты пируватдегидрогеназного комплекса (разд. 12.2.1) и другие мультиферментные комплексы. В самом деле, так как основная роль генов заключается в кодировании полипептидных цепей, то сборка должна быть преимущественно самосборкой, т. е. без дальнейшего вмешательства генетических детерминант. Для некоторых вирусов, например бактериофага Т4 (гл. 28) и рибосом (гл. 26), было показано, что эти сложные структуры могут быть разобраны на индивидуальные компоненты и затем возможно спонтанное восстановление нативной структуры, если добавлять компоненты в определенном порядке. Тот факт, что многие органеллы и мембранные структуры содержат также липиды, полисахариды и т. д. и для правильной сборки необходимо присутствие и этих соединений, не противоречит этой точке зрения, так как эти компоненты клетки также образуются при каталитическом действии ферментов, структура которых генетически детерминирована.

25.5.2. Протетические группы и модификация аминокислот

Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что не существует прямого генетического контроля за процессами, с помощью которых неаминокислотные протетические группы вводятся в белки. Спонтанная рекомбинация гема с глобином при образовании гемоглобина (разд. 6.6) указывает на то, что нет необходимости предполагать какой-либо специальный генетический контроль.

Аналогичным образом многие ферменты, содержащие способную диссоциировать протетическую группу или кофактор, например флавины, гем, пиридоксальфосфат, NAD, NADP или ионы металлов, регенерируются спонтанно при добавлении протетической группы к апоферменту (белку) в подходящих условиях. Можно привести еще более удивительный пример. Беспорфириновый мутант *E. coli* не обладает каталазной активностью. Однако если добавить порфирин, то образуется активная каталаза, что свидетельствует о синтезе апофермента даже в отсутствие синтеза протетической группы.

В белках содержится обычно только двадцать аминокислот (гл. 4). Модификация этих остатков путем фосфорилирования, метилирования, гидроксилирования, иодирования, гликозилирования и т. д. происходит во время или после окончания образования полипептидной цепи. Ферменты, определяющие эти процессы и их специфичность, находятся под генетическим контролем; специфич-

Таблица 25.4

Некоторые ковалентные модификации аминокислот в белках

Модифицируемая аминокислота	Производное	Тип белка
Н-Концевые остатки	Ацетилированные Gly, Ala, Ser и т. д.	Различные белки
Аргинин	Различные N-метилпроизводные	Гистоны, белки мозга
Аспарагин	Гликозилирование амидного азота	Различные глобулярные гликопротеиды
С-Концевые остатки	α -Карбоксамид	Различные гормоны
Цистеин	Цистин	Различные белки
Цистеин	Связывание с FAD	Некоторые ферменты, цитохром
Цистеин	Тиольный эфир протопорфирина	
Глутаминовая кислота	γ -Карбоксиглутамил	Протромбин и др.
Глутаминовая кислота и лизин	γ -Глутамил- ϵ -N-лизил	Фибрин
N-Концевой глутамин	Пирролидонкарбоновая кислота	Различные белки
Гистидин	N ¹ - или N ³ -метилпроизводное	»
Оксилизин	O-Гликозилоксилизин	Коллагены
Оксипролин	O-Гликозилоксипролин	Коллагены, экстензины
Лизин	δ -Оксилизин	Коллагены
Лизин	ϵ , N-Моно-, ди- и триметиллизины	Гистоны и т. д.
Лизин	δ -Окси- ϵ -N-триметиллизин	Диатомовый белок
Лизин	ϵ -N-Ацетиллизин	Гистоны
Лизин	Лизиналь	Коллагены
Лизин	Лизинонорлейцин	Коллагены, эластины
Лизин	Десмозин, изодесмозин	Эластины
Лизин	Биотинил по ϵ -аминогруппе	Карбоксилазы
Лизин	Липоил по ϵ -аминогруппе	Пируватдекарбоксилаза
Лизин	Основание Шиффа с пиридоксальфосфатом	Многие ферменты
Пролин	3-Оксипролин	Коллагены
Пролин	4-Оксипролин	Коллагены, эластин

Продолжение*

Модифицируемая аминокислота	Производное	Тип белка
Пролин	3,4-Дноксипролин	Диатомовый белок
Серин	О-Гликозилсерин	Различные гликопротеиды
Серин	О-Фосфопантетеин	Ацилпереносящий белок
Серин	О-Фосфосерин	Различные белки
Серин	N-Концевой пируват	Некоторые ферменты
Треонин	О-Гликозилтреонин	Различные гликопротеиды
Треонин	N-Концевой α -кетобутирил	Некоторые ферменты
Тирозин	Тирозин-О-сульфат	Фибриноген и т. д.
Тирозин	o-Дитирозин, o-тритирозин	Резилин
Тирозин	Моно- и диодтирозин	Тироглобулин, скелетные белки кораллов, медуз и т. д.
Тирозин	Трииодтирозин, тироксин	Тироглобулин
Тирозин	Моно и дибромтирозин	Скелетные белки кораллов и т. д.
Тирозин	Ортоокисление	Меланины
Тирозин	Аденилирование	Глутаминсинтетаза

ческие остатки, которые подвергаются модификации, определяются в одних белках последовательностью аминокислот, а в других — конформацией. В некоторых случаях модификация служит для контроля активности ферментов и является обратимой, например, у фосфорилазы (разд. 15.2.3) и глутаминсинтетазы (разд. 20.2.3). В других случаях простетическая группа может быть ковалентно связана с белком, например амидная связь соединяет биотин с ϵ -аминогруппой лизина в карбоксилирующем ферменте (разд. 14.5). Примеры ковалентной модификации аминокислотных остатков в белках перечислены в табл. 25.4. Производные, являющиеся промежуточными продуктами ферментативных реакций, а также металлолиганды многих ферментов в таблице не приведены.

Ковалентные сшивки между пептидными цепями имеются во многих фибриллярных белках, таких, как коллаген и эластин. Сшивки образуются в результате реакций, протекающих после синтеза полипептидных цепей. Образование необычных аминокислот, таких, как десмозин и изодесмозин из лизиновых остатков в эластине, является примером таких процессов (гл. 38).

25.5.3. Проблемы кодирования

Так как генетический контроль определяет только аминокислотную последовательность, и как ДНК, так и пептидные цепи являются линейными полимерами, то они должны быть *коллинеарны* в том смысле, что последовательность оснований должна определять аминокислотную последовательность. Однако ДНК состоит из четырех оснований, а именно А, G, C и T, а белок — из 20 аминокислот. Хотя в ДНК могут присутствовать в небольших количествах и другие основания, но они функционируют как случайные заменители одного из обычных оснований. Например, метилцитозин спаривается с гуанином таким же образом, как и цитозин.

Двадцать аминокислот, входящие в состав белков, стандартно сокращаются так: Ala, Arg, Asp, Asn, Cys, Glu, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr и Val (табл. 4.1). Цистин отсутствует в этом списке, так как в белки включается цистеин, а цистин образуется в результате последующего окисления из двух цистеиновых остатков. Глутамин и аспарагин включены в этот список, так как включение каждой из этих аминокислот в полипептиды находится под независимым генетическим контролем.

Так как в ДНК содержится всего четыре основания, а в белках — 20 аминокислот, то кодирующая единица, или *кодон*, т. е. специфическая комбинация оснований, определяющая включение аминокислоты, должна содержать более чем одно основание. Если кодон для каждой аминокислоты содержит два основания, то возможно $4^2 = 16$ кодонов. Для кодонов из трех оснований (триплетов) возможно $4^3 = 64$ комбинации, что более чем достаточно для кодирования 20 аминокислот. Все имеющиеся сведения говорят о том, что кодон состоит из трех оснований (гл. 26).

Изучение различных белков показало, что точечная мутация, т. е. замена одной пары оснований, наследуется по законам Менделя и затрагивает только одну аминокислоту в полипептидной цепи. Более того, мутации, близко расположенные на генетической карте (согласно данным по генетической рекомбинации), приводят к близко расположенным изменениям в аминокислотной последовательности. Это было обнаружено при исследованиях на α -белке триптофансинтетазы *E. coli* (гл. 26) и белке оболочки бактериофага T4 (гл. 28). Такие исследования дали прямые доказательства коллинеарности пептидной цепи и ДНК в гене (гл. 26).

См. литературу к главе 26.

Глава 26

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МЕТАБОЛИЗМА. II

Гены и белковый синтез. Генетический код. Контроль белкового синтеза

26.1. Ген и белковый синтез

В этой главе будут рассмотрены механизмы белкового синтеза. Так как белки синтезируются из отдельных аминокислот, то основные вопросы можно сформулировать так: 1) каким образом становится доступной энергия, необходимая для образования пептидных связей? 2) каким образом последовательность нуклеотидов ДНК переводится в специфическую аминокислотную последовательность белка? 3) каковы генетические механизмы, определяющие, когда должна быть использована генетическая информация?

Перед рассмотрением деталей механизма белкового синтеза коротко рассмотрим основные черты процесса в целом. Процесс можно разбить на три стадии:

1. Синтез с помощью фермента РНК-полимеразы нити РНК, которая является комплементарной копией одной из двух нитей матричной ДНК; это процесс *транскрипции*. При этом синтезируются три типа РНК — матричная (мРНК), рибосомная (рРНК) и транспортная (тРНК). Гибридизационные исследования (гл. 7) показали, что в хромосоме имеются уникальные последовательности, комплементарные каждой из этих РНК.

2. *Созревание* РНК-транскрипта путем расщепления специфическими эндонуклеазами, в результате чего первичные РНК-транскрипты превращаются в функционально активные мРНК, рРНК и тРНК.

3. *Трансляция* мРНК на рибосомах — цитоплазматических частицах, содержащих рРНК и белки, с участием тРНК, в результате чего образуется полипептидная цепь.

Следует подчеркнуть две основные черты процесса трансляции: 1) синтез полипептидной цепи начинается с N-концевой аминокислоты, и элонгация цепи происходит путем последовательного присоединения аминокислот. Временная последовательность добавления аминокислот к растущей полипептидной цепи коллинеарна с последовательностью аминокислотных остатков в этой цепи, начиная с аминоконцевого остатка. 2) мРНК «прочитывается» группами из трех нуклеотидов (*кодоны*), начиная с определенной

точки; триплетный кодон определяет, какая из 20 аминокислот должна быть добавлена к растущей полипептидной цепи.

Обсуждение деталей белкового синтеза мы начнем с рассмотрения механизма трансляции, затем перейдем к генетическому коду и, наконец, рассмотрим механизм транскрипции и его контроль.

26.2. Компоненты механизма трансляции

26.2.1. Транспортная РНК (тРНК)

Каждая молекула тРНК представляет собой единую цепь примерно из 80 нуклеотидов, многие из которых модифицированы (табл. 7.6). Нуклеотидная последовательность более чем 50* моле-

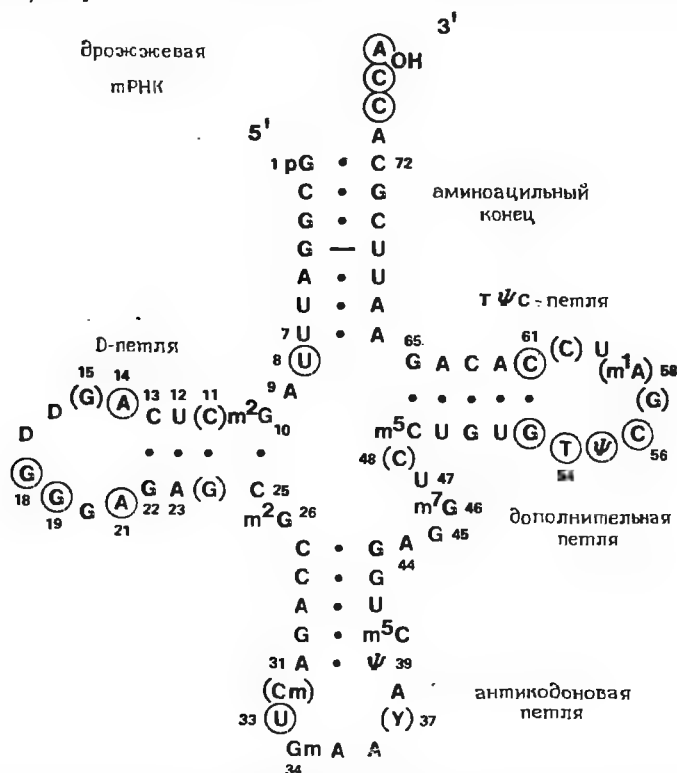


Рис. 26.1. Схема структуры клеверного листа для тРНК^{Phe} дрожжей. Инвариантные основания для всех тРНК обведены кружком; полуинвариантные, например пурины или пиримидины, указаны в скобках. (Jack A., Ladner J. E., Klug A., J. Mol. Biol., 108, 619, 1976.)

* В настоящее время известна первичная структура более 120 видов молекул тРНК. — Прим. перев.

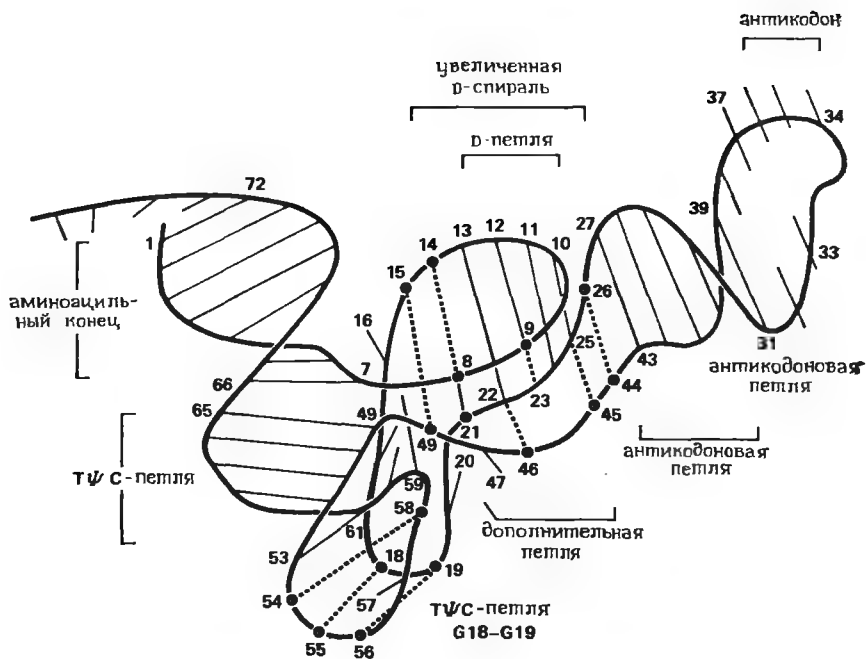


Рис. 26.2. Схема трехмерной структуры дрожжевой тРНК^{Phe}, показывающая укладку цепи и взаимодействия между основаниями. Рибозофосфатный скелет показан непрерывной линией. Длинные прямые линии показывают пары оснований в двуспиральных участках; короткие линии обозначают неспаренные основания; пунктирные линии обозначают пары оснований вне спирали. (Jack A., Ladner J. E., Klug A., J. Mol. Biol., 108, 619, 1976.)

кул тРНК уже установлена; исходя из первичной структуры, все молекулы тРНК могут быть представлены в виде двумерного «клеверного листа», в котором многие основания спарены (рис. 26.1). Нуклеотидные звенья, не вовлеченные в образование водородных связей в клеверном листе, образуют пять характерных структурных элементов: 1) 3'-конец, состоящий обычно из четырех остатков, среди которых три последних в большинстве случаев ССА. Карбоксильная группа соответствующей аминокислоты с помощью аминоацил-тРНК-синтетазы (см. ниже) связывается 3'-гидроксидной группой концевой аденозинового остатка*; 2) ТψС-петля, состоящая из семи нуклеотидных остатков, среди которых всег-

* Согласно результатам некоторых авторов, в ряде случаев идет связывание аминокислоты по 2-гидроксидной группе. — Прим. перев.

да есть последовательность 5'-ТфСG-3'; 3) сильно варьирующая (по размеру и составу) *дополнительная петля*; 4) *антикодонная петля*, состоящая из семи остатков, включающая последовательность, комплементарную кодону: например, кодону в мРНК 5'-GCC-3' соответствует антикодон 3'-CIG-5'; 5) *D-петля*, состоящая из 8—12 остатков и содержащая несколько дигидроуридиновых остатков. Предполагается, что участки тРНК, не вовлеченные в связывание аминокислоты и в выполнение декодирующей функции, используются для связывания тРНК с рибосомой (ТфС-петля) и со специфической аминоацил-тРНК-синтетазой (D-петля).

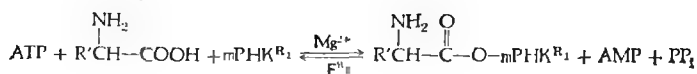
Так как метилированные и другие модифицированные основания локализованы на участках, не вовлеченных в образование водородных связей, то, возможно, что модифицированные нуклеотиды играют некоторую роль в создании подходящей конформации тРНК.

Можно полагать, что третичные структуры всех тРНК весьма похожи, так как даже смесь различных тРНК образует кристаллы. Как видно из рис. 26.2, трехмерная структура дрожжевой фенилаланиновой тРНК содержит такие же двуспиральные участки, что и двумерная структура «клеверного листа». Однако дополнительные водородные связи изгибают «клеверный лист» в Г-образную структуру. При этом антикодон расположен на одном конце, а на другом на расстоянии ~ 80 Å расположена ССА-группа, акцептирующая аминокислоту, а D- и ТфС-петли взаимодействуют друг с другом, образуя угол буквы Г. Во многих отношениях сложная упаковка тРНК напоминает упаковку полипептидной цепи и согласуется с множественными высокоспецифическими взаимодействиями молекул тРНК как с белками, так и с другими нуклеиновыми кислотами, в частности с рибосомными.

26.2.2. Активация аминокислот и их присоединение к тРНК

Общая схема этого процесса представлена на рис. 26.3. Часть энергии, необходимой для белкового синтеза, дает АТФ при этерификации каждой аминокислоты соответствующей молекулой тРНК. Первая стадия заключается в образовании связанного с ферментом аминоацил-аденилатного комплекса (реакция (1)), при которой карбоксильная группа образует ангидрид с фосфатной группой АМР. Затем происходит перенос аминоацильного остатка на специфическую тРНК (реакция (2)); карбоксильная группа аминокислоты образует сложноеэфирную связь с 3'-гидроксидной группой концевой аденозинового остатка тРНК. Обе стадии катализируются одним ферментом — *аминоацил-тРНК-синтетазой*, который специфичен как по отношению к аминокислоте, так и по отношению к тРНК и нуждается в Mg^{+2} . В ходе этого процесса каждая

общая реакция



стадии реакции

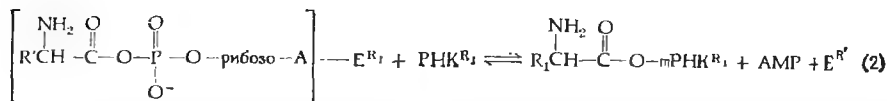
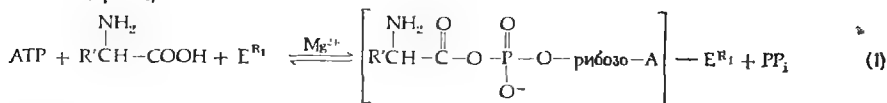


Рис. 26.3. Аминоацилирование тРНК. R' — специфическая аминокислота, которая должна связаться с соответствующей тРНК (тРНК^{R₁}) при катализе специфиче-

ской аминоацил-тРНК-синтетазой (E^{R₁}) $\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)-\text{O}-\text{рибозо}-\text{А}$ — аденилатный остаток аминоациладенилата.

аминокислота активируется и связывается со специфическим набором соответствующих тРНК.

Многие синтетазы уже получены в очищенном, а некоторые — в кристаллическом состоянии. Часть из них состоит из одной полипептидной цепи, например валиновая, изолейциновая и лейциновая ($M \sim 100\,000$). Некоторые состоят из одинаковых, каталитически активных субъединиц, например метиониновая (четыре субъединицы с M по 45 000) и сериновая (две субъединицы с M по 45 000). В третью группу входят синтетазы, содержащие неодинаковые субъединицы, например глициновая, которая состоит из двух субъединиц с M по 33 000 и двух с M по 80 000; триптофановая (из поджелудочной железы быка) имеет также состав $\alpha_2\beta_2$, но молекулярная масса всех субъединиц одинакова и равна 27 000.

Точность трансляции определяется главным образом специфичностью аминоацил-тРНК-синтетазной реакции. Специфическая уникальная аминокислотная последовательность каждого из многих белков, образующихся в одной клетке, свидетельствует о малой частоте ошибок при этой реакции. Действие этого прецизионного механизма можно проиллюстрировать на примере изолейцил-тРНК-синтетазы. Этот фермент должен отличить изолейцин от валина, которые различаются только на одну метиленовую группу. Некоторая специфичность достигается уже на уровне связывания субстрата ($K_m^{\text{Ile}} = 5\text{ мМ}$, $K_m^{\text{Val}} = 0,4\text{ мМ}$). Однако в то время, когда

фермент-изолейциладенилатный комплекс реагирует с соответствующей тРНК и образует изолейцил-тРНК, фермент-валиладенилатный комплекс быстро гидролизует в присутствии изолейцин-специфичной тРНК с образованием свободного валина и АМР.

Хотя для каждой из 20 аминокислот, обычно образующих белки, имеется только по одной аминоксил-тРНК-синтетазе, для каждой из аминокислот может быть несколько тРНК. Каждая синтетаза может, однако, узнавать все тРНК, специфичные для одной аминокислоты. Для двадцати аминокислот, обычно содержащихся в белках, существуют специфичные тРНК. Другие аминокислоты возникают в результате различных модификаций в полипептидной цепи (табл. 25.4).

26.2.3. Рибосомы

Матрица (мРНК) и различные аминокислотированные тРНК встречаются на рибосомах, где и происходит сборка полипептидной цепи. Рибосома состоит из большой и малой субъединиц, каждая из которых содержит РНК и белки. В животных клетках большая часть рибосом связана с мембранами эндоплазматического ретикулума.

У прокариот функциональная рибосома имеет константу седиментации 70S и $M 3 \cdot 10^6$. 70S-частицы состоят из малой (30S) и большой (50S) субъединиц. 30S-субъединица содержит молекулу 16S РНК (1520 нуклеотидных остатков) и 21 молекулу различных белков с M от 10 700 до 65 000. 50S-субъединица ($M 2 \cdot 10^6$) содержит две молекулы РНК — 23S РНК (3100 нуклеотидов) и 5S РНК (120 нуклеотидов) и 34 белка с M от 9 000 до 28 500.

Рибосомы эукариот (80S) имеют $M 4,5 \cdot 10^6$. Как и прокариотные рибосомы, они состоят из малой (40S) и большой (60S) субъединиц. 40S-субъединица содержит 18S РНК (~ 2000 нуклеотидов) и примерно 30 белков. 60S-субъединица содержит 28S РНК (4000 нуклеотидов), 5S РНК (121 нуклеотид) и 5.8S РНК (~ 155 нуклеотидов); в состав частицы входит также примерно 50 различных белков.

Рибосомальная РНК содержит модифицированные основания, однако не так много, как тРНК. В 23S и 16S РНК *E. coli* были обнаружены метилированные основания и псевдоуридин. У эукариот в 28S РНК были обнаружены 2'-О-метилированные нуклеозидные остатки. 5S РНК содержит только четыре обычных нуклеотида.

30S-субъединицы рибосом *E. coli* были реконструированы из 21 белка и 16S РНК. Аналогичным образом была реконструирована и 50S-субъединица. В обоих случаях чрезвычайно важен порядок добавления рибосомальных компонентов при реконструкции; это указывает на то, что стадии самосборки рибосомальных субъ-

единиц должны выполняться в определенной последовательности. Такая спонтанная реконструкция двух функциональных органелл из большого количества компонентов является ярким примером самосборки сложных клеточных систем. Как расположены белки и нуклеиновые кислоты в рибосомах, пока неизвестно, однако уже имеются некоторые сведения о взаимоотношениях рибосомальных белков и РНК.

26.2.4. Информационная РНК

Геномная ДНК, агрегированная в хромосомах, расположена в ядре. Если информация, закодированная в ДНК, должна быть использована для управления белковым синтезом на рибосомах, то информация должна быть передана из ядра на рибосому с помощью промежуточного переносчика. Обилие РНК в цитоплазме и многочисленные свидетельства важности РНК для белкового синтеза говорят о том, что эту функцию передачи информации выполняют некоторые виды РНК. Изучение кинетики синтеза ферментов у *E. coli* привело к заключению, что контроль образования белков осуществляется путем синтеза короткоживущих посредников, скорее всего РНК. В связи с этим посредник не должен накапливаться в отличие от ДНК, тРНК и рРНК. Поэтому было постулировано кратковременное существование мРНК. Этот тип РНК может составлять лишь малую долю от общей клеточной РНК, большую часть которой составляют рРНК и тРНК (см. ниже).

Длина цепочки мРНК зависит от длины полипептидной цепи, которая должна быть синтезирована на этой РНК. Так, при триплетном коде (см. ниже) для полипептида из 100 аминокислотных остатков ($M \sim 11\,000$) необходимо 300 нуклеотидов в кодирующей последовательности, а для полипептида с $M\,110\,000$ — 3000 нуклеотидов. Кроме того, мРНК может содержать некодирующую (лидерную) последовательность на 5'-конце; эти последовательности могут быть различной длины. Например, мРНК, кодирующая ферменты метаболизма галактозы и биосинтеза триптофана, имеют лидерные последовательности длиной 26 и 150 нуклеотидов соответственно. Обе эти мРНК кодируют более чем одну полипептидную цепь и называются *полигенными* или *полицистронными* мРНК. Полигенные мРНК содержат некодирующие межгенные области, длина которых тоже меняется в широких пределах. Одной из функций некодирующих лидерных и межгенных последовательностей может быть правильное размещение малой рибосомной субъединицы, чтобы она могла инициировать трансляцию на кодоне, соответствующем N-концевому аминокислотному остатку.

Как было отмечено ранее, гибридизационные эксперименты показали наличие в ДНК последовательностей, комплементарных ко

всем трем типам РНК, а именно рРНК, тРНК и мРНК. Таким образом, все три типа РНК синтезируются на матрице ДНК. В сущности, роль ДНК как генетического материала сводится к тому, чтобы служить матрицей как для репликации, так и для синтеза всех типов РНК, необходимых для экспрессии гена. В любой момент времени мРНК составляет от 3 до 4% общей клеточной РНК *E. coli*, а рРНК и тРНК составляют от 80 до 85% и от 10 до 15% соответственно. Тем не менее только примерно 0,2% нуклеотидов генома *E. coli* используется для синтеза около 60 типов тРНК и 0,5% генома — для синтеза рибосомных РНК. Таким образом, более 99% ДНК служит матрицей для синтеза мРНК.

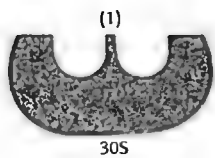
26.3. Механизм трансляции

Выше были рассмотрены три основных компонента белкового синтеза (мРНК с лидерной последовательностью, тРНК и рибосомы), теперь остановимся на том, как протекает этот процесс. Трансляцию мРНК в полипептидную последовательность можно представить себе как состоящую из трех последовательных фаз: 1) *инициация* белковой цепи — высокоспецифический процесс, важность которого возрастает из-за того, что многие мРНК полицистронны; 2) *элонгация цепи*, т. е. последовательное добавление отдельных аминокислотных остатков (перенос их с аминоацил-тРНК); 3) *специфическая терминация* пептидной цепи и удаление ее с рибосомы.

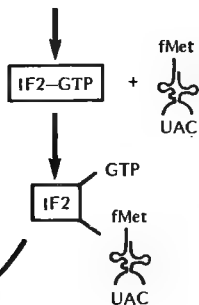
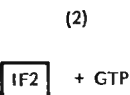
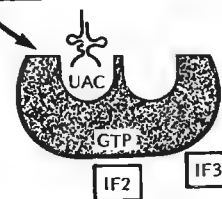
26.3.1. Инициация синтеза полипептидов

Существуют две метионинспецифичные тРНК; одна, обозначаемая $\text{тРНК}_{\text{м}}^{\text{Met}}$, акцептирует метиониновые остатки и включает их в полипептидные цепи; другая, $\text{тРНК}_{\text{f}}^{\text{Met}}$, играет уникальную роль в инициации синтеза полипептидов. Обе при взаимодействии с одной и той же аминоацил-тРНК-синтетазой образуют заряженную $\text{тРНК}_{\text{f}}^{\text{Met}}$, т. е. $\text{met-тРНК}_{\text{f}}^{\text{Met}}$. У прокариот аминогруппа $\text{met-тРНК}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ может быть формилирована (но не $\text{met-тРНК}_{\text{м}}^{\text{Met}}$) с помощью N^{10} -формилтетрагидрофолиевой кислоты в присутствии специфической *трансформилазы*. При этом образуется N-формил- $\text{met-тРНК}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ ($\text{fmet-тРНК}_{\text{f}}^{\text{Met}}$), которая и участвует в инициации полипептидной цепи (рис. 26.4). Хотя все полипептиды у прокариот иницируются формилметионином, формильная группа впоследствии удаляется *деформилазой*; в ряде случаев и метиониновый остаток удаляется с N-конца полипептидной цепи под действием аминокептидазы.

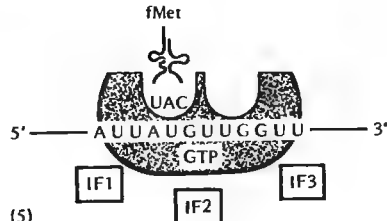
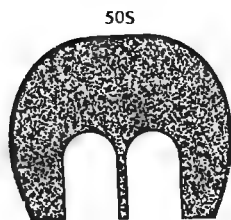
В дополнение к $\text{fmet-тРНК}_{\text{f}}^{\text{Met}}$, мРНК, 30S и 50S рибосомальным субъединицам для процесса инициации у прокариот необходимы:



(3)



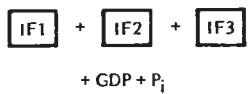
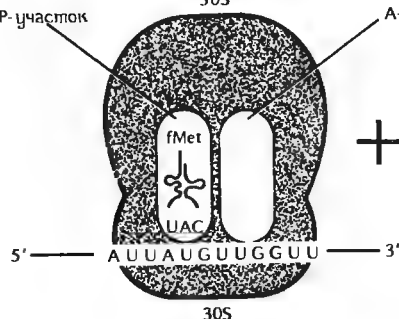
(mPHK) 5'—AUUAUGUUGGU—3'



(5)

P-участок

A-участок

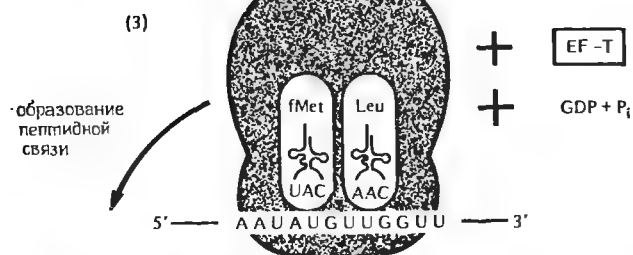
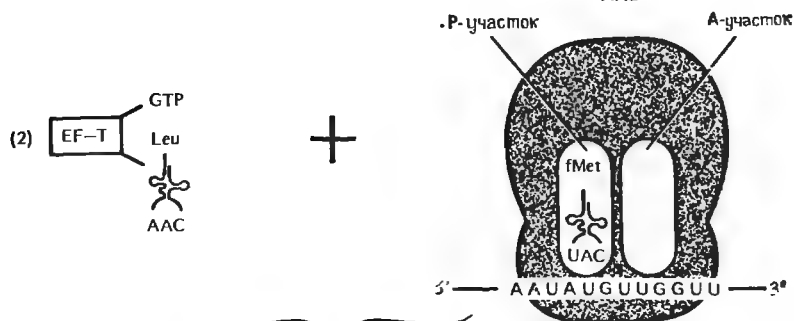
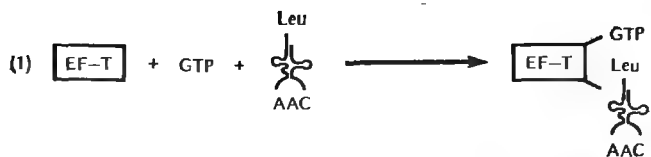


еще три белка, которые не входят обычно в состав рибосом. Они называются *факторами инициации* (IF) и обозначаются IF1 ($M\ 9\ 000$), IF2 (M от 65 000 до 80 000) и IF3 ($M\ 29\ 000$). Процесс начинается с присоединения IF3 к свободной 30S-субъединице (рис. 26.4). На второй стадии $\text{fmet-tRNA}_i^{\text{Met}}$ связывается IF2-GTP-комплексом, который в результате следующей стадии реагирует с агрегатом IF3-30S. Образовавшийся инициаторный комплекс затем связывается с мРНК, вероятно, с помощью IF1. Наконец, 50S-субъединица образует комплекс с 30S-субъединицей, что сопровождается высвобождением всех трех факторов инициации, а также GDP и P_i . Комплекс $\text{fmet-tRNA}_i^{\text{Met}}$ — мРНК — 70S-рибосома, образующийся в результате этих инициаторных процессов, имеет два участка связывания тРНК, называемых А-участком (аминокислотный участок) и Р-участком (пептидилный участок). В Р-участке расположена $\text{fmet-tRNA}_i^{\text{Met}}$, при этом антикодон 3'-UAC-5', вероятно, связан с метиониновым кодоном 5'-AUG-3' (см. ниже).

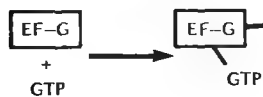
Таким образом, рамка считывания определена в результате специфического взаимодействия рибосомы и $\text{fmet-tRNA}_i^{\text{Met}}$ с мРНК. Определение последовательности 3'-конца 16S рРНК *E. coli* показало, что имеется некоторая комплементарность этого участка с лидерной межгенной последовательностью мРНК, которая определяет синтез UDP-галактозоэпимеразы и β -галактозидазы (гл. 15); более того, соответствующий бимолекулярный комплекс был выделен из рибосом *E. coli*. Таким образом, 3'-концевая последовательность 16S рРНК может играть роль при выборе инициаторного участка в мРНК. Так как в 5S РНК имеется последовательность, комплементарная Т ψ С-петле тРНК, 5S РНК может выполнять некоторые функции по связыванию тРНК.

У эукариот инициаторная тРНК для цитоплазматического синтеза полипептидов также является метиониновой; однако соответствующая $\text{met-tRNA}_i^{\text{Met}}$ не формируется. Она реагирует также с факторами инициации eIF1, 2 и 3, с 40S рибосомальной субъединицей и мРНК. Последующие реакции идут по той же схеме, что и для прокариотных рибосом (рис. 26.4). В отличие от этого синтез

Рис. 26.4. Инициация белкового синтеза. В ходе первой стадии 30S-субъединица рибосом связывает фактор инициации IF3. На второй стадии $\text{fmet-tRNA}_i^{\text{Met}}$ связывается с комплексом IF2-GTP, который на третьей стадии связывается с 30S-субъединицей, содержащей IF3. Образовавшийся инициаторный комплекс связывается с мРНК с помощью IF1 (реакция (4)). На пятой стадии 50S-субъединица образует комплекс с 30S-субъединицей, что сопровождается высвобождением GDP, P_i и трех факторов инициации. Комплекс 70S-рибосома — мРНК — $\text{fmet-tRNA}_i^{\text{Met}}$ теперь содержит А- и Р-участки связывания тРНК.



транслокация



пустой
А-участок



полипептидов в митохондриях и хлоропластах идет так же, как и у прокариот. А именно инициация идет с помощью $fmet\text{-}tRNA_f^{Met}$ и 30S рибосомальный комплекс реагирует с 50S-субъединицей.

26.3.2. Элонгация полипептидной цепи

После того как синтез полипептида был иницирован, продолжение этого процесса требует присоединения аминокацил- $tRNA$ со второй аминокислотой ($aa_2\text{-}tRNA^{AA_2}$), которая определяется следующим кодоном мРНК (мРНК движется в рибосоме 5'-концом вперед). Эта аминокацил- $tRNA$ ($aa_2\text{-}tRNA^{AA_2}$) связывается по А-участку комплекса $fmet\text{-}tRNA_f^{Met}$ —мРНК—70S, где, по-видимому, расположен следующий кодон. Эта реакция требует GTP и фактор роста цепи (элонгации) EF-T (состоящий из двух субъединиц EF_{tu} и EF_{ts}), как показано на рис. 26.5 (реакции (1) и (2)) для лейцил- $tRNA^{Leu}$. Аналогичный фактор элонгации у эукариот обозначается EF-1.

В пептидилтрансферазном центре, расположенном на 50S-субъединице рибосомы, происходит перенос формилметионинового остатка (или пептидильного остатка на последующих стадиях) на аминокислотную группу $aa_2\text{-}tRNA^{AA_2}$, занимающей Р-участок. Таким образом, пептидная цепь растет в результате поочередного добавления аминокислотных остатков по карбоксильному концу цепи. На этой стадии растущая цепь, связанная с последней добавленной $tRNA$, расположена в А-участке.

В результате реакции, требующей другого фактора элонгации — EF-G (EF-2 у эукариот) и GTP, рибосома претерпевает транслокацию на один кодон (три звена) вдоль мРНК. При этом $fmet\text{-}aa_2\text{-}дипептидил\text{-}tRNA^{AA_2}$ передвигается из А- в Р-участок, освобождается незаряженная $tRNA_f^{Met}$ и GTP гидролизуются до GDP и P_i . Цикл вновь повторяется при добавлении следующей аминокислоты ($aa_3\text{-}tRNA^{AA_3}$).

Рис. 26.5. Стадии роста пептидной цепи. Образуется тройной комплекс, содержащий EF-T, GTP и заряженную $tRNA$ ($Leu\text{-}tRNA^{Leu}$), чей антикодон (ААС) соответствует кодону, следующему за инициаторным AUG. Этот комплекс реагирует с 70S-рибосомальным комплексом таким образом, что $Leu\text{-}tRNA^{Leu}$ связывается с А-участком последнего, а EF-T, GDP и P_i высвобождаются. Пептидилтрансферазный центр катализирует перенос формилметионинового остатка на аминокислотную группу $Leu\text{-}tRNA^{Leu}$, занимающей А-участок. В реакции, заключающей эту цепь превращений, необходимы EF-G и GTP, мРНК транслоцируется на один кодон. В результате $fmet\text{-}Leu\text{-}дипептидил\text{-}tRNA^{Leu}$ перемещается из А- в Р-участок, высвобождается $tRNA_f^{Met}$ и GTP гидролизуются до GDP и P_i . Затем цикл повторяется для каждой последующей аминокислоты.

26.3.3. Терминация элонгации

Терминация элонгации полипептидной цепи происходит при специфических сигналах терминации, которыми являются один или несколько из следующих триплетов: UAA, UAG и UGA. Эти триплеты называются *терминаторными* (или *нонсенс-триплетами*). Появление этих триплетов в любом месте приводит к терминации элонгации и освобождению полипептидной цепи, что происходит в результате гидролиза связи между пептидом и тРНК, расположенными в Р-участке. При этом и пептид и тРНК покидают рибосому, которая затем диссоциирует до 30S и 50S-субъединиц. У прокариот в терминации участвуют два белка R_1 и R_2 . R_1 (М 44 000) промоторирует терминацию на UAA- и UAG-кодонах, а R_2 (М 47 000) — на UAA- и UGA-кодонах. Белковые факторы терминации и те же самые терминаторные триплеты используются также при синтезе белка у эукариот.

На весь процесс расходуется 3 экв. АТФ при синтезе каждой пептидной связи. Так, 1 молекула АТФ расходуется на активацию аминокислоты и образование аминоацил-тРНК; 2 молекулы GTP гидролизуются до GDP и P_i во время элонгации. Так как для инициации необходима дополнительная молекула GTP, то для синтеза первой пептидной связи необходимо 4 экв. АТФ.

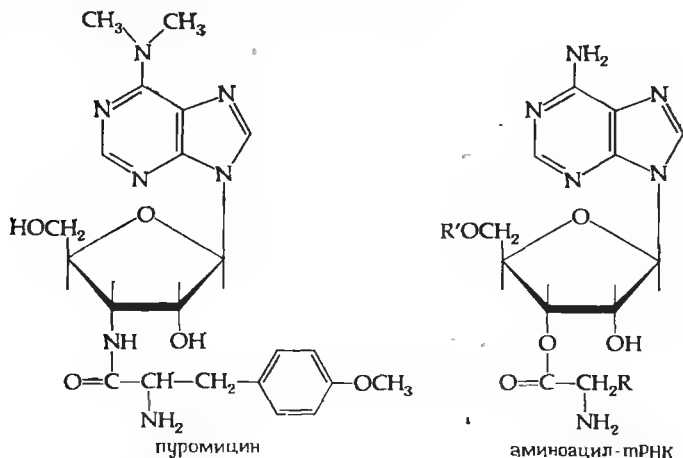
Почти всегда молекула мРНК транслируется одновременно большим количеством рибосом; образующаяся при этом структура называется *полирибосома* или *полисома*. У бактерий трансляция 5'-конца мРНК идет уже тогда, когда еще не закончен синтез 3'-конца самой мРНК. Часто мРНК содержит информацию о нескольких белках, каждый из которых закодирован в соответствующем участке мРНК (полицистронная матрица). В этом случае рибосомы и законченные полипептидные цепи освобождаются на каждом терминаторном сигнале, а синтез следующей пептидной цепи требует реинициации на начальном участке каждого цистрона.

26.3.4. Ингибиторы синтеза белков

Как и при исследовании других сложных метаболических процессов, ингибиторы отдельных специфических реакций сыграли большую роль при выделении стадий биосинтеза нуклеиновых кислот и белков. Некоторые из этих ингибиторов являются синтетическими соединениями, другие были впервые выделены из культуральных фильтратов различных организмов как антибиотики и использовались при попытках лечить инфекционные заболевания или ингибировать рост малигнизированных тканей. Соединения, которые ингибируют образование пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, косвенно блокируют образование нуклеиновых кислот; они описаны в гл. 24. Ингибиторы синтеза мРНК, которые блокируют ДНК-зависимую РНК-полимеразу, будут рассмотрены ниже. В этом

разделе мы рассмотрим ингибиторы, которые являются антибиотиками и влияют на трансляцию мРНК. Обладая способностью специфически реагировать с рибосомами прокариот, некоторые из этих агентов получили широкое распространение при лечении инфекционных заболеваний.

Пуромицин, который структурно аналогичен аминоксил-тРНК, ингибирует синтез белка, маскируясь под аминоксиладенозиную часть аминоксил-тРНК и конкурируя с аминоксил-тРНК в качестве акцептора при реакции транспептидации. После того как растущий пептид или формилметионин переносятся на аминоксильную группу пуромицина, вновь образованный пептидил- или формилметионилпуромицин покидает рибосому; это прерывает нормальный рост цепи, и неполная пептидная цепь, имеющая пуромициновый остаток на карбоксильном конце, уходит с рибосомы.



Стрептомицин ингибирует синтез белка, связываясь с 30S-субъединицей; стрептомицин-30S-комплекс образует менее эффективный и более лабильный инициаторный комплекс, диссоциация которого прерывает процесс трансляции. Связывание стрептомицина с 30S-субъединицей также меняет эффективность и точность связывания аминоксил-тРНК с соответствующим кодоном в А-участке. Устойчивость к стрептомицину и, более того, зависимость от него возникают в результате мутационных изменений отдельных белков рибосомальной 30S-субъединицы.

Тетрациклин ингибирует элонгацию полипептидных цепей, блокируя вхождение аминоксил-тРНК в А-участок; растущая полипептидная цепь остается в Р-участке и может нормально реагировать с пуромицином.

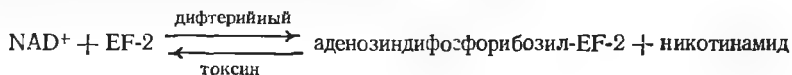
Хлорамфеникол блокирует пептидилтрансферазную активность 50S-субъединицы в 70S-рибосомах.

Циклогексими́д, как предполагают, действует таким же образом, как и хлорамфеникол, на 60S-субъединицу в 80S-рибосомах.

Эритромицин связывается с 50S-рибосомной субъединицей и, вероятно, блокирует стадию транслокации, «замораживая» таким образом пептидил-тРНК в А-участке. Мутации, приводящие к устойчивости к эритромицину, затрагивают один из белков 50S-субъединицы рибосом *E. coli*.

Фусидовая кислота — стероид, который влияет на стадию транслокации после образования пептидной связи, вероятно, предотвращая расщепление GTP в сопряженной реакции расщепления GTP и транслокации с участием фактора EF-2.

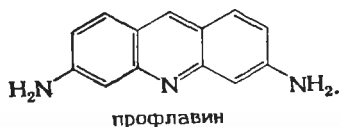
Дифтерийный токсин специфически ингибирует синтез белков у эукариот, но не у прокариот. После того как интактный токсин попадает в клетку, он претерпевает расщепление трипсиноподобным ферментом, в результате чего образуется фрагмент, который блокирует транслокацию, оставляя растущую пептидилную цепь в А-участке. Активным фрагментом токсина является фермент, который катализирует перенос ADP-рибозной части NAD^+ на белок EF-2, таким образом блокируя его активность. Реакция ADP-рибозилирования обратима, и ADP-рибоза может быть удалена с EF-2 добавлением большой концентрации никотинамида.



26.4. Генетический код

В связи с тем что в ДНК имеются только четыре типа оснований, а белки содержат 20 аминокислот, очевидно, что для кодирования аминокислоты необходимо более одного основания. Пара или дублет оснований может кодировать только 16 аминокислот (4^2); в связи с этим было предсказано, что *кодон*, т. е. нуклеотидная последовательность, кодирующая аминокислоту, должен быть триплетным.

Самая первая экспериментальная проверка этой идеи заключалась в проверке последствий действия красителя профлавина на πII -локус бактериофага T4 (гл. 28).



Благодаря способности интеркалировать между основаниями в двойной спирали ДНК профлавин может вызывать делеции или

вставки нуклеотидов в геном во время репликации. Такое генетическое изменение приводит к образованию нефункционирующего белка из-за того, что рамка считывания кодонов сдвинута в точке делеции или вставки. В результате этого аминокислотная последовательность полностью меняется, начиная с точки делеции или вставки в сторону С-конца пептидной цепи, как показано на условном примере с делецией:

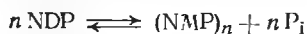
нормальное считывание	Phe-	Lys-	Pro-	Phe-	Gln-	Lys-	Gly-	Asn
	UUU	AAA	CCC	UUC	CAG	AAG	GGU	AAU
после делеции	Phe-	Lys-	Pro-		Ser	-Arg	-Arg	-Val

Однако делеция трех нуклеотидов подряд приводит к образованию белка, в котором делетирована одна аминокислота. При этом рамка считывания для остальной части белка сохраняется. Если делеции (или вставки) нуклеотидов происходят не в соседних положениях цепи, то аминокислотная последовательность меняется только на участке между первым и последним изменением в полинуклеотидной цепи. Действительно, было показано, что введение путем кроссинговера в гII-ген фага Т4 трех делеций (или вставок) приводит к образованию функционально активного белка; две или одна делеция (или вставка) дают неактивный белок. Этот результат свидетельствует о том, что код является триплетным, т. е. должен считываться группами по три нуклеотида.

Выяснение генетического кода, т. е. определение тринуклеотидных последовательностей, характерных для каждой аминокислоты, стало возможным после обнаружения того, что синтетический полимер — poly(U) (гл. 7) может служить в качестве мРНК для синтеза полифенилаланина в экстрактах *E. coli*, способных к белковому синтезу. Среди 18 аминокислот, испытанных в этой системе, только фенилаланин дал соответствующий полипептид. Следовательно, принимая во внимание триплетность кода, тринуклеотид UUU является кодоном фенилаланина.

В дальнейшем генетический код был расшифрован с помощью трех типов экспериментов:

1. *Использование полинуклеотидов, синтезированных с помощью фермента полинуклеотидфосфорилазы.* Этот фермент катализирует следующую реакцию:



где NDP — любой рибонуклеозидифосфат, а $(\text{NMP})_n$ — полимер, содержащий n рибонуклеозидмонофосфатных остатков. Как было отмечено выше, poly(U) приводит к синтезу полифенилаланина. Poly(C) и poly(A) приводят к образованию полипролина и полили-

зина соответственно. Такие гомополимеры и сополимеры, полученные из смесей рибонуклеозиддифосфатов, были использованы для выяснения состава кодонов, соответствующих определенным аминокислотам; однако такой подход не позволяет определить последовательность оснований в кодоне.

2. *Связывание тринуклеотидов известной последовательности и соответствующих тРНК с рибосомами.* Poly(U) может связываться с рибосомами, образуя комплекс, связывающий только фенилаланиновую тРНК. Аналогичным образом тринуклеотиды с известной последовательностью, связавшись с рибосомами, приводят к связыванию только определенных тРНК. Так, 5'-UUG-3' способствует связыванию лейциновой аминоацелированной тРНК и т. д. Наиболее эффективными тринуклеотидами являются такие, у которых свободны 3' и 2'-концевые гидроксидные группы, а 5'-гидроксидная группа фосфорилирована. Хотя изучение связывания тРНК в присутствии тринуклеотидов в большинстве случаев дает однозначный результат, некоторые отнесения кодонов были сомнительны либо вследствие низкого уровня связывания, либо из-за необходимости проведения эксперимента в нефизиологических условиях, в частности при высоких концентрациях Mg^{2+} .

3. *Однозначное отнесение кодонов с помощью сополимеров с известной нуклеотидной последовательностью.* Представим себе рибосополимер, состоящий из многократно повторенных динуклеотидов XY. Такой сополимер можно представить в виде последова-

тельного ряда триплетов XYX и YXY, т. е. $\overline{X-Y-X}$ - $\overline{Y-X-Y}$ - $\overline{X-Y-X}$ что

должно кодировать альтернирующую последовательность из двух аминокислот. Например, в том случае, если X и Y — это U и G, то на таком полинуклеотиде синтезируется альтернирующая последовательность (...цистеил-валил...). Аналогичные эксперименты были проведены с полинуклеотидами, содержащими повторяющиеся тринуклеотиды или тетрануклеотиды. Результаты многих экспериментов такого рода и изучение связывания тринуклеотидов позволили установить все триплетные кодоны, соответствующие всем 20 аминокислотам.

Эксперименты с определенными сополимерами позволили также определить инициаторные кодоны и лучше понять условия, необходимые для точной трансляции в бесклеточной системе. Например, сополимер ...G-A-U-G-A-U-G-A-U-G-A-U-... должен кодировать полиметионин (AUG AUG AUG) и полиаспарат (GAUGAUGAU) при высоких концентрациях Mg^{2+} (0,05 M). Третья рамка считывания (UGA UGA UGA) не дает полипептида, так как UGA — терминирующий кодон. Однако при более низкой

концентрации Mg^{+2} (0,005 M) синтез полипептида либо не идет совсем, либо идет очень слабо, если только в дополнение к $met\text{-}tRNA^{Met}$ не присутствует $i\text{-}met\text{-}tRNA_i^{Met}$. В этом случае только полипептид $iMet\text{-}Met\text{-}Met\ldots$ синтезируется с заметным выходом. Аналогичным образом $\ldots G\text{-}U\text{-}G\text{-}U\text{-}G\text{-}U\text{-}G\text{-}U\ldots$ при высокой концентрации Mg^{+2} дает альтернирующий полипептид $\ldots$ цистеил-валин $\ldots$, как уже было отмечено выше, но при низкой концентрации магния синтез полипептида также практически не идет до тех пор, пока не добавлена $i\text{-}met\text{-}tRNA_i^{Met}$. В этом случае синтезирующийся полипептид имеет последовательность $iMet\text{-}Cys\text{-}Val\text{-}Cys\text{-}Val\text{-}\ldots$. Это свидетельствует о том, что GUG может также кодировать инициаторный метионин, хотя, находясь в середине цепи, он кодирует валин. Это заключение было подтверждено при изучении последовательности природной мРНК (см. ниже).

Таблица 26.1
Словарь кодонов для аминокислот^а

Первое положение	Второе положение				Третье положение
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	(CT)	(CT)	A
	Leu	Ser	(CT)	Trp	G
G	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met(CI)	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val(CI)	Ala	Glu	Gly	G

^а Первое положение в кодоне в мРНК с 5'-конца, третье положение — нуклеотид, связанный со следующим триплетом в мРНК; CI — инициаторный кодон, соответствующий N-концевой аминокислоте в пептидной цепи; CT — кодон терминатин, расположенный вслед за кодоном COOH-концевой аминокислоты.

Полный словарь кодонов приведен в табл. 26.1. Заметьте, что из 64 возможных триплетов все, кроме трех, транслируются либо как инициаторные, либо как внутренние кодоны. UAA, UAG и UGA не транслируются — они являются сигналами терминации трансляции. Многие аминокислоты кодируются несколькими триплетами. Такая ситуация в тайнописи называется *вырожденностью*, т. е. когда возможно записать одно и то же сообщение несколькими способами. Но хотя код и вырожден, он не является *неоднозначным* — ни один кодон, кроме GUG, не кодирует более чем одну аминокислоту. Как было отмечено выше, GUG является инициаторным сигналом для fmet в начале трансляции, но кодирует валин внутри аминокислотных последовательностей.

В большинстве случаев вырожденность вызывает наличие нескольких различных тРНК для одной аминокислоты, отличающихся по антикодонам, но в других случаях одна тРНК может транслировать более чем один кодон. Оба случая проиллюстрированы в табл. 26.2. Так, тРНК^{Gly} III может транслировать GGU и GGC, но

Таблица 26.2
Молекулы тРНК, переносящие глицин

Глициновые тРНК	Антикодоны в тРНК	Глициновые кодоны, узнаваемые тРНК
тРНК ^{GlyI} GGG	3'-CCC-5'	5'-GGG-3'
тРНК ^{GlyII} GGA/G	3'-CCU-5'	5'-GGA-3' 4'-GGG-3'
тРНК ^{GlyIII} GGU/C	3'-CCA-5'	5'-GGU-3' 5'-GGC-3'

не может транслировать два других кодона глицина, в то время как тРНК^{GlyII} обладает противоположной специфичностью. С другой стороны, тРНК^{GlyI} транслирует только GGG-кодон. Последняя тРНК может оказаться не необходимой для пептидного синтеза в том случае, если присутствуют две другие глициновые тРНК.

В том случае, когда один антикодон может узнавать более чем один кодон, различие этих кодонов всегда касается только 3'-концевого положения кодона. Эту характерную особенность можно объяснить при помощи так называемой гипотезы «качаний» (wobble). Суть гипотезы заключается в том, что третье основание кодона может давать необычные пары, которые примерно соответствуют стандартным А-У и G-С-парам. В табл. 26.3 приведены типы спаривания, разрешенные с точки зрения гипотезы «качаний». В целом предсказания гипотезы оказались правильными, о чем свидетель-

Таблица 26.3

Спаривание оснований, допустимое с точки зрения гипотезы «качаний»

Основания третьего положения антикодона	Основания третьего положения кодона
G	U или C
C	G
A	U
U	A или G
I	A, U или C

ствуют данные о последовательности антикодонов многих тРНК. Следует отметить, однако, одно исключение из этих правил образования пар. Из табл. 26.2 видно, что антикодон тРНК^{Gly III} 3'-ССА-5' узнается глициновым кодоном 5'-GGC-3'.

26.4.1. Универсальность кода

Код, вероятно, универсален. Такое заключение косвенно вытекает из анализа изменений аминокислотной последовательности при мутациях у столь разнородных белков, как α -цепь триптофан-синтетазы *E. coli* (разд. 26.6.1) и гемоглобина человека (разд. 26.5.6). Это подтверждается непосредственно определением первичной структуры природных мРНК. В табл. 26.4 суммированы результаты, полученные из анализа первичной структуры РНК фага MS2 (гл. 28) и трех вирусспецифичных полипептидов, для которых эта РНК является матрицей. В РНК фага MS2 обнаружены все кодоны, кроме кодона терминации UGA.

В пользу универсальности генетического кода свидетельствуют также данные, полученные при изучении гомологичных белков. Согласно этим данным, большие участки первичной структуры белков остаются неизменными даже при сравнении белков весьма отдаленных видов. Например, одна треть аминокислотной последовательности цитохрома с одинакова у различных видов эукариот — животных, растений и грибов (гл. 27). Это свидетельствует о консервативности, в результате которой важнейшие особенности первичной структуры сохраняются даже при длительной эволюции (гл. 27). Трудно представить себе такую устойчивость структуры, если код непрерывно изменяется в ходе эволюции*.

* Хотя код синтеза белков в цитоплазме эукариот и у прокариот одинаков, но недавно были получены данные, свидетельствующие об отличии кода для синтеза белков в митохондриях. — *Прим. перев.*

Таблица 26.4

Кодоны, обнаруженные при установлении первичной структуры РНК фага MS2^a

	U		C		A		G		
U	Phe	10	Ser	13	Tyr	8	Cys	7	U
	Phe	13	Ser	10	Tyr	13	Cys	4	C
	Leu	11	Ser	10	(CT)	1	(CT)		A
	Leu	4	Ser	13	(CT)	1	Trp	14	G
C	Leu	10	Pro	7	His	4	Arg	13	U
	Leu	14	Pro	3	His	4	Arg	11	C
	Leu	13	Pro	6	Gln	10	Arg	6	A
	Leu	6	Pro	5	Gln	16	Arg	4	G
A	Ileu	8	Thr	14	Asn	11	Ser	4	U
	Ileu	16	Thr	10	Asn	23	Ser	8	C
	Ile	7	Thr	8	Lys	12	Arg	8	A
	Met	15	Thr	5	Lys	17	Arg	6	G
G	Val	13	Ala	19	Asp	18	Gly	17	U
	Val	12	Ala	12	Asp	11	Gly	11	C
	Val	11	Ala	14	Glu	9	Gly	4	A
	Val	10	Ala	8	Glu	14	Gly	4	G

^a Цифры обозначают, сколько раз этот кодон встречается в нуклеотидной последовательности РНК фага MS2. CT — кодон терминации. (Уотсон Д. Молекулярная биология гена — М.: Мир, 1978.)

Если бы код не был практически инвариантен, то изменение цистеиновой тРНК, например, в триптофановую привело бы к тому, что во всех пептидных цепях вместо цистеина будет включен триптофан. В результате этого станут неактивными все ферменты, которые нуждаются в сульфгидрильной группе для проявления активности, не будут образовываться дисульфидные мостики, а введение объемистого триптофанового остатка будет затруднять укладку полипептидной цепи и реализацию нормальной конформации белковой молекулы. Такая мутация с образованием неправильного антикодона будет, очевидно, летальна для гаплоидной клетки и вредной, если не летальной, для диплоидной клетки. Неправильное прочтение кода продуктом супрессорного гена (см. ниже) является,

по-видимому, редким явлением, которое приводит к выживанию только в том случае, если дает клетке новые преимущества.

О происхождении и причинах универсальности генетического кода нет ясной информации. Химическая логика не связывает антикодон тРНК или кодон мРНК с кодируемой аминокислотой. Нет также никаких очевидных сведений, объясняющих, почему одни аминокислоты кодируются одним или двумя кодонами, а другие имеют шесть кодонов. Тем не менее появившийся однажды код должен стать неизменным. Его универсальность является одним из сильнейших аргументов в пользу того, что все живые организмы произошли от единого предшественника.

Механизмы репликации ДНК, образования РНК и трансляция белка практически одинаковы для всех организмов. Эволюционные изменения, приведшие к бесконечному разнообразию организмов, происходили не в результате существенных изменений биосинтетических процессов, а путем образования новых генов для синтеза новых ферментов или других белков, обладающих новыми структурами и функциями. Эти проблемы будут рассмотрены ниже.

26.4.2. Мутации

Изменение последовательности оснований в любой цепи ДНК приведет к устойчивым наследственным изменениям, так как последующая репликация увековечит эти изменения. Каждое изменение геномной ДНК отразится на мРНК и, следовательно, на кодируемом белке или на рибосомальных или транспортных РНК*.

Точечные мутации отражают изменения единичных оснований (или пар оснований в двухнитевой ДНК), как показано при изучении с помощью кроссингвера тонкой структуры одиночных генов. Это может привести к единичной замене основания в мРНК и к замене аминокислоты в пептидной цепи, что является наиболее обычным генетическим изменением.

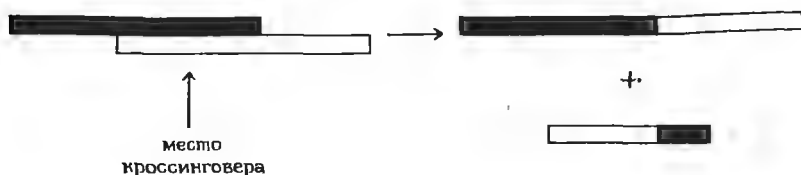
Точечные мутации возникают в результате включения неправильного основания или за счет ошибок копирования. Действие азотистой кислоты на нуклеиновую кислоту, например на рНК вируса табачной мозаики, приводит к дезаминированию оснований, превращая С в U и А в I, который читается как G. Последующие изменения аминокислотной последовательности вирусного белка согласуются с теми, которые предсказываются изменениями кодонов (табл. 25.1). Гидроксилламин превращает цитозин в N⁴-оксицитозин, что и вызывает мутации. Как было отмечено выше (гл. 7),

* Это утверждение недостаточно строгое, поскольку значительную часть ДНК занимают регуляторные последовательности, модификация которых не отражается на структуре транскриптов. — *Прим. перев.*

некоторые аналоги пуринов или пиримидинов либо соответствующие нуклеозиды или нуклеотиды, которые включаются в ДНК, являются мутагенами, так как они могут вызывать ошибки при репликации. Среди таких аналогов следует отметить 5-бром- и 5-иодурацилы, 2-аминопурин, 2,6-диаминопурин и т. д.

Некоторые акридиновые красители, например профлавин, которые могут интеркалировать между основаниями в цепи ДНК, вызывают делеции (или вставки) отдельных нуклеотидов, а не точечные замены (разд. 26.4). Делеции отдельных аминокислот обнаружены в гомологичных белках из различных видов организмов, даже в гемоглобине человека (гл. 31). Хотя механизм таких «природных» делеций неизвестен, они, вероятно, возникают в результате разрывов цепи ДНК и утраты отдельных нуклеотидов. На самом деле, такие делеции в геноме можно обнаружить непосредственно при наблюдении гетеродуплексов (гл. 25). Алкилирующие агенты также могут вызывать разрывы хромосом — за счет реакции с фосфатной группой и последующего расщепления лабильных триэфиров по связи между сахарным остатком и фосфатной группой.

Гомологичные хромосомы спариваются во время конъюгации в диплоидных организмах. Если хромосомы совмещены неправильно, может произойти неравный кроссинговер; в результате этого происходят удлинение одной хромосомы и укорочение другой. Одна из многих возможных интерпретаций такого события приведена ниже.



На основе результатов, полученных при изучении структуры белков, можно предположить, что таким путем происходит удлинение цепи гемоглобина (гл. 31), гаптоглобина (гл. 29), иммуноглобулинов (гл. 30) и т. д.

Изменение терминирующего кодона (табл. 26.1) приводит к удлинению полипептидной цепи на С-конце, если новый кодон допускает включение аминокислоты (разд. 26.5.6.1). Теоретически возможно также удлинение полипептидной цепи с N-конца. Гомологичные цитохромы с из различных видов различаются числом аминокислотных остатков на N-конце. Неизвестно, представляют ли собой более длинные цепи примитивные типы, хотя то, что они обнаружены только у растений, грибов и беспозвоночных, свидетельствует о том, что эти остатки были утрачены в ходе эволюции (гл. 27).

26.4.3. Супрессорные гены

Многие генетические исследования показали, что мутация в определенном положении генома может быть ревертирована в результате второй мутации. Такая реверсия к нормальному или дикому фенотипу может произойти просто в результате восстановления исходной последовательности у измененного кодона. Однако в некоторых случаях вторая мутация происходит в другом гене; такая реверсия за счет мутации в другом гене известна под названием *супрессорной мутации*. Один из классов таких мутаций обусловлен мутациями в гене, кодирующем тРНК. Представим себе следующие три типа мутаций в кодирующей последовательности: 1) кодон дикого типа превращается в кодон терминации, или нонсенс-кодон, что приводит к преждевременному обрыву трансляции; это так называемые *нонсенс-мутации*; 2) кодон дикого типа превращается в другой кодон, кодирующий другую аминокислоту, что приводит к аминокислотной замене в полипептидной цепи; это так называемые *миссенс-мутации*; 3) в кодирующей последовательности появляется дополнительное основание, что приводит к сдвигу рамки считывания; это *мутации сдвига рамки*. Каждый из этих типов мутаций может быть супрессирован продуктом супрессорного гена, который возникает в результате изменения последовательности оснований в тРНК. Примеры каждого типа супрессии приведены ниже.

26.4.3.1. Супрессия нонсенс-мутаций

Изменения последовательности, которые приводят к изменениям тирозиновых кодонов 5'-UAC-3' и 5'-UAU-3' в 5'-UAG-3', являются нонсенс-мутациями, приводящими к преждевременному обрыву полипептидной цепи. Мутация в гене триптофановой тРНК, приводящая к превращению антикодона 3'-AUG-5' в 3'-AUC-5', позволяет транслировать кодон терминации 5'-UAC-3' тирозином и, таким образом, супрессировать нонсенс-мутацию.

26.4.3.2. Супрессия миссенс-мутаций

Введение А в 5'-положение глицинового кодона 5'-GGG-3' приводит к аргининовому кодону. Такая миссенс-мутация может быть супрессирована в результате мутации в гене тРНК^{Gly I}, приводящей к превращению антикодона 3'-CCC-5' в 3'-UCC-5'; такая мутантная тРНК может узнавать аргининовый кодон. Как видно из табл. 26.3, глициновый кодон 5'-GGG-3' может быть прочитан другой глициновой тРНК (тРНК^{Gly II}), поэтому мутация в гене тРНК^{Gly I} не препятствует трансляции кодонов 5'-GGG-3' в других местах генома.

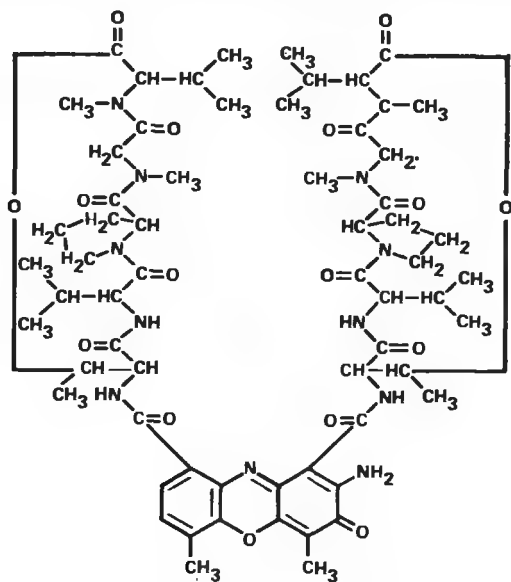
26.4.3.3. Мутации сдвига рамки

Мутации сдвига рамки, которые возникают в результате включения дополнительного основания, также могут быть супрессированы за счет мутаций в генах тРНК. Так, мутация в гене тРНК^{Gly} приводит к появлению дополнительного основания в антикодоновой петле тРНК и антикодон 3'-ССС-5' превращается в 3'-СССС-5'. Введение дополнительного основания позволяет тРНК прочитывать четыре вместо трех оснований в мРНК. Предполагается, что это сопровождается смещением мРНК вдоль поверхности рибосомы на четыре, а не на три нуклеотида. Это исправляет сдвиг рамки, вызванный добавлением лишнего основания в мРНК.

Супрессия делеционных мутаций до сих пор не обнаружена.

26.5. Транскрипция

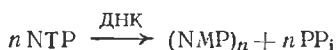
Посредником при транскрипции генома является *ДНК-зависимая РНК-полимераза*. Добавление к клеткам специфического ингибитора транскрипции — актиномицина D, который блокирует



актиномицин D

стадию элонгации при синтезе РНК, интеркалируя между парами G-C в двуспиральной ДНК, блокирует синтез всех типов РНК — матричной, рибосомальной и транспортной. Следовательно, РНК-

полимераза ответственна за синтез всех клеточных РНК. РНК-полимераза катализирует инициацию, элонгацию и терминацию полинуклеотидной цепи и нуждается в присутствии всех четырех рибонуклеозидтрифосфатов в качестве субстратов. Реакция абсолютно зависит от присутствия ионов двухвалентных металлов (Mg^{2+} или Mn^{2+}) и нуждается в ДНК или полидезоксирибонуклеотиде в качестве матрицы. В простейшем виде РНК-полимеразную реакцию можно записать следующим образом:



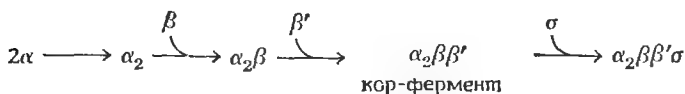
В отличие от ДНК-полимеразы (гл. 25) при работе РНК-полимеразы матрица полностью сохраняется в исходном состоянии и может быть использована повторно, т. е. играет чисто каталитическую роль; она не является затравкой, которая должна быть удлинена и включена в продукт.

В отличие от бактерий, которые содержат один вид РНК-полимеразы, эукариотические клетки содержат несколько различных полимераз, которые локализованы в различных субклеточных фракциях и ответственны за синтез различных типов РНК. Более детально это будет обсуждено ниже.

26.5.1. Структура бактериальных РНК-полимераз

Наиболее хорошо изученным ферментом такого рода является РНК-полимераза *E. coli*. Это белок большой молекулярной массы (M 480 000), состоящий из четырех субъединиц, обозначаемых β' , β , α и σ (M 160 000, 150 000, 40 000 и 86 000 соответственно). Эти субъединицы входят в фермент в количественном соотношении 1:1:2:1. Комплекс, содержащий только α -, β - и β' -субъединицы называется *кор-ферментом*.

Мутанты *E. coli*, устойчивые к рифампицину и стрептолидигину, которые являются специфическими ингибиторами РНК-полимеразы, содержат измененную β -субъединицу. Некоторые температурочувствительные мутанты *E. coli* содержат специфически измененную β' -субъединицу. Все четыре субъединицы необходимы для образования активного фермента из субъединиц. Воссоздание фермента происходит в определенном порядке:



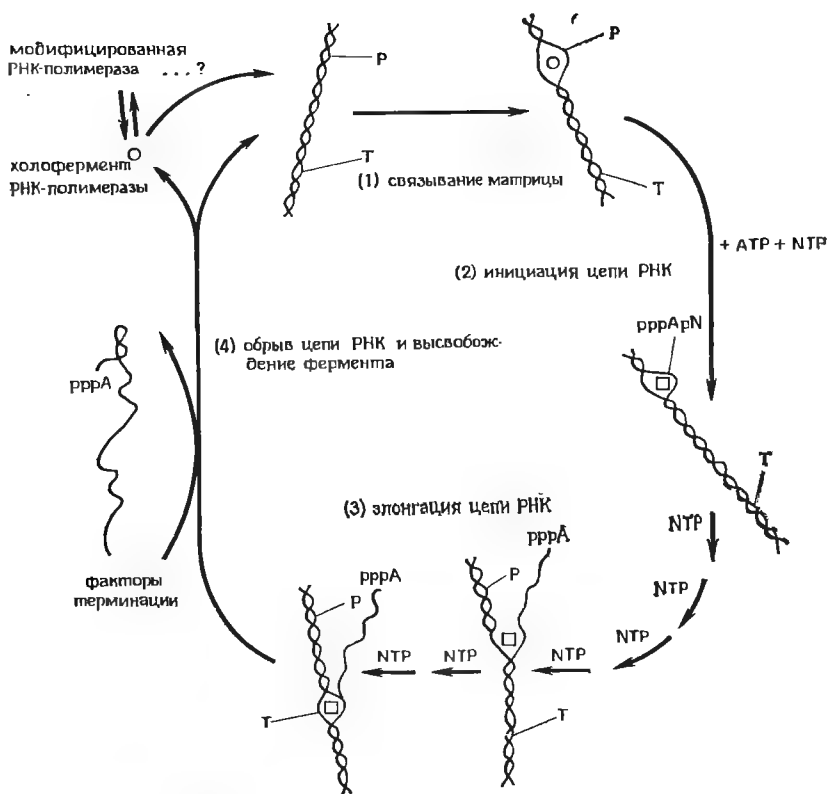


Рис. 26.6. Цикл транскрипции. Диаграмма показывает стадии синтеза транскрипта РНК прокариотной РНК-полимеразой. Р и Т обозначают промоторную и терминаторную последовательности, NTP — рибонуклеозидтрифосфаты. (Chamberlin M. J., p. 17 in R. Losick and M. Chamberlin, eds., RNA Polymerase. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1976.)

26.5.2. Стадии в синтезе РНК, направляемом ДНК

ДНК-зависимый синтез РНК с помощью РНК-полимеразы можно разбить на несколько стадий, которые в целом составляют *цикл транскрипции* (рис. 26.6). Этими стадиями являются: 1) связывание матрицы, 2) инициация цепи, 3) элонгация и 4) терминация и освобождение фермента.

26.5.2.1. Связывание с матрицей

Первая стадия транскрипционного цикла включает взаимодействие РНК-полимеразы с матричной ДНК и образование двойного комплекса, который может связывать рибонуклеозидтрифосфаты и

инициировать синтез цепи РНК. Хотя РНК-полимераза проявляет заметное сродство ко всем участкам молекулы ДНК, с исключительно высокой константой связывания ($K_{\text{асс}} = 2 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$) она связывается только с отдельными последовательностями на одной из двух нитей матричной ДНК — на так называемых *промоторных* участках. Несколько дальше расположены инициаторные участки, с которых и начинается транскрипция соответствующего гена. σ -Субъединица уменьшает неспецифическое связывание РНК-полимеразы с ДНК на три порядка и может таким образом способствовать ускорению и повышению эффективности нахождения ферментом промоторного участка. Связывание РНК-полимеразы с промоторным участком приводит к частичному плавлению (расхождению нитей) спирали ДНК в этом участке с образованием так называемого *открытого промоторного комплекса*. Таким образом, фермент должен открыть ограниченное количество пар оснований, чтобы получить доступ к информации, которая должна транскрибироваться.

Прочное связывание РНК-полимеразы с ДНК приводит к тому, что примерно 40 нуклеотидных остатков не подвергаются действию панкреатической ДНАзы (гл. 7). Это позволило выделить промоторы ряда матриц и установить последовательность некоторых из них.

Белки-репрессоры, которые препятствуют транскрипции с определенных промоторных участков (см. ниже), блокируют образование открытых промоторных комплексов. В тех случаях, которые были исследованы наиболее подробно, репрессор прочно связывается с определенной последовательностью вблизи от или непосредственно в составе промотора на так называемом *операторном участке* (см. ниже) и препятствует транскрипции, непосредственно блокируя доступ РНК-полимеразы к промотору.

26.5.2.2. Инициация и элонгация

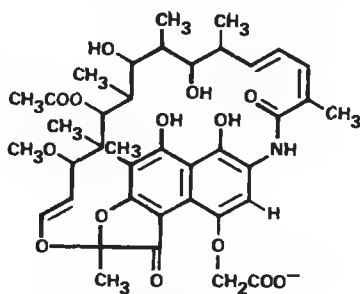
Инициация цепи РНК с помощью РНК-полимеразы происходит без помощи затравки. АТР и ГТР могут служить специфическими иницирующими нуклеотидами с образованием динуклеозидтетрафосфата согласно следующей реакционной схеме:



Этот динуклеотид элонгируется путем последовательного присоединения рибонуклеозидмонофосфата к 3-гидроксидному концу



Рифампицин, который связывается с β -субъединицей РНК-полимеразы, полностью ингибирует реакцию инициации.



рифамицин В
(рифампицин)

Стрептолидин, который также связывается с β -субъединицей, блокирует элонгацию цепи. Это свидетельствует о том, что β -субъединица участвует как в инициации, так и в процессе синтеза РНК. Действие актиномицина D, предотвращающее рост цепи, было описано выше (разд. 26.5).

После инициации элонгации происходит существенное уменьшение сродства σ -субъединицы в РНК-полимеразе. Эта субъединица диссоциирует от холофермента и может быстро взаимодействовать с другой молекулой кор-фермента РНК-полимеразы, если она доступна. Рост цепи, вероятно, сопровождается плавлением пар оснований только в той части дуплекса ДНК, которая подвергается транскрипции. Взаимодействие между матричной ДНК и РНК-транскриптом является временным, и полное спаривание оснований в двуспиральной ДНК восстанавливается после завершения транскрипции. Таким образом, транскрипция в отличие от репликации ДНК является полностью консервативным процессом.

26.5.2.3. Терминация цепи и высвобождение фермента

Терминация синтеза РНК при участии РНК-полимеразы происходит *in vitro* на специфических последовательностях и сопровождается высвобождением фермента. В других случаях терминация некоторых транскриптов *in vitro* не происходит на тех же участках, что и *in vivo*, и продолжается на прилежащих участках. В некоторых, но не всех случаях, которые были изучены, терминация на соответствующих участках *in vitro* может быть индуцирована добавлением белка, который называется *p-фактор*. Этот фактор, который обычно не ассоциирован с холоферментом РНК-полимеразы, явля-

ется олигомерным белком (M 50 000) и был впервые идентифицирован по способности уменьшать количество РНК при транскрипции *in vitro* благодаря индукции терминации. ρ -Фактор, ассоциированный с ДНК, обладает АТРазной активностью. Образующаяся цепь РНК может освободиться от ДНК, но РНК-полимераза остается связанной с ДНК. Таким образом, ρ -фактор сам по себе не вызывает высвобождения фермента от матрицы после завершения транскрипции, и для заключительной стадии процесса транскрипции необходимы некоторые дополнительные факторы.

26.5.3. РНК-полимеразы эукариот

РНК-полимеразы были выделены из тимуса теленка, культуры клеток человека, печени крысы и дрожжей. В каждом случае в ядерной фракции было обнаружено три различных фермента. Все три — высокомолекулярные белковые комплексы (M от 500 000 до 700 000) и содержат чрезвычайно сложный набор субъединиц. Один из этих ферментов, называемый *РНК-полимеразой I*, или *A*, состоит из шести субъединиц с M 200 000, 126 000, 51 000, 44 000, 25 000 и 16 500 соответственно в соотношении 1:1:1:1:2:2. *РНК-полимераза II*, или *B*, состоит из пяти субъединиц с M 214 000, 140 000, 34 000, 25 000 и 16 000 соответственно. *РНК-полимераза III*, или *C*, содержит по крайней мере десять полипептидов с M 155 000, 138 000, 89 000, 70 000, 53 000, 49 000, 41 000, 32 000, 29 000 и 19 000 соответственно.

Хотя все три РНК-полимеразы являются ядерными ферментами, их локализация в ядре, так же как и функции, различна. Так, РНК-полимераза I обнаружена в ядрышке и катализирует синтез рибосомальных РНК. РНК-полимераза II присутствует в нуклеоплазме и, вероятно, ответственна за синтез мРНК. РНК-полимераза III также присутствует в нуклеоплазме, и считается, что она ответственна за синтез 5S РНК и тРНК. Эти три фермента различаются также по чувствительности к α -аманитину, токсическому началу гриба *Amanita phalloides*. α -Аманитин специфически ингибирует РНК-полимеразу II, и клетки, устойчивые к α -аманитину, содержат РНК-полимеразу II, устойчивую к этому яду. РНК-полимераза I полностью устойчива по отношению к α -аманитину, а РНК-полимераза III ингибируется им, но для этого необходима в 1000 раз большая концентрация α -аманитина, чем для ингибирования РНК-полимеразы II.

Хотя это еще не изучено детально, эукариотические РНК-полимеразы очень похожи на соответствующие бактериальные ферменты как по требованиям к матрице и предшественникам, так и по катализируемым ими реакциям. Синтез РНК идет через ряд стадий, включая связывание фермента, вероятно со специфическими промоторными участками, инициацию роста цепи, которая начинается

обычно с АТР или GTP, рост цепи и, наконец, обрыв и высвобождение цепи.

Митохондрии содержат РНК-полимеразу, которая четко отличается от ядерных ферментов и, вероятно, используется для синтеза митохондриальных РНК. Следует отметить, что фермент из митохондрий *Neurospora crassa* имеет малую молекулярную массу ($M 64\,000$) и состоит из единственной полипептидной цепи. Как и бактериальные РНК-полимеразы, он ингибируется рифампицином, но нечувствителен к α -аминитину, что, возможно, отражает прокариотическое происхождение митохондрий.

26.5.4. Созревание РНК-транскриптов

Многие первичные транскрипты претерпевают посттранскрипционную модификацию, которая может быть четырех типов: 1) эндонуклеолитическое расщепление длинных первичных транскриптов, которые могут быть в некоторых случаях полигенными, т. е. содержать более чем одну кодирующую последовательность; 2) добавление нуклеотидов к 3'-концу транскрипта; 3) добавление нуклеотидов к 5'-концу транскрипта; 4) модификация оснований в транскрипте, происходящая чаще всего в тРНК (гл. 7). Как отмечено ниже, регуляция экспрессии гена может осуществляться на уровне созревания РНК и на уровне транскрипции.

26.5.4.1. Рибосомные РНК

У прокариот 16S и 23S РНК образуются путем созревания 30S-предшественника ($2,1 \cdot 10^6$), который расщепляется на две цепи с $M 0,6 \cdot 10^6$ (17S) и $1,2 \cdot 10^6$ (25S), которые далее превращаются в 16S и 23S РНК, входящие в состав прокариотических рибосом. 5S РНК также образуется из 30S-предшественника в результате эндонуклеазного расщепления, возможно у 5'-конца. Нуклеотидная последовательность, соответствующая 16S РНК, располагается у 5'-конца предшественника, и расщепление 30S предшественника начинается до завершения его транскрипции. Начальное расщепление предшественника катализируется РНазой III, впервые идентифицированной как РНaza, которая специфически расщепляет двуспиральные РНК. У мутантов *E. coli*, дефектных по РНазе III, рибосомные РНК накапливаются в виде 30S-предшественников. Поэтому расщепление предшественника может идти по двуспиральным водородносвязанным участкам в составе одонитевого предшественника, хотя, возможно, расщепление идет также по специфическим последовательностям. Ферменты, ответственные за образование зрелых 16S и 23S РНК из их 17S и 25S-предшественников, пока неизвестны.

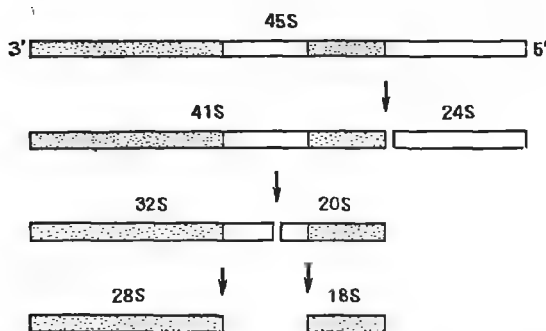


Рис. 26.7. Схема созревания рРНК из клеток человека (HeLa). Затемиенные участки показывают последовательности 28S и 18S РНК. (Wellauer P. K., David I. B., Kelley D. E., Perry R. P., J. Mol. Biol., 89, 397, 1974.)

У эукариот гены 18S и 28S рибосомных РНК обнаружены в виде тандемно повторяющихся блоков (гл. 25). Следует еще раз отметить, что каждый блок состоит из транскрибируемых сегментов и нетранскрибируемых спейсеров. Первичным транскриптом генов рибосомных РНК является большая РНК-предшественник, которая затем созревает с помощью до сих пор неидентифицированных РНАз, образуя 18S и 28S-продукты, как показано на рис. 26.7. Гены рибосомной 5S РНК не являются частью этого тандема, но расположены в виде тандема ген — спейсер в геноме. Большие предшественники 5S РНК не были обнаружены.

26.5.4.2. Транспортные РНК

Все исследованные прокариотические тРНК сначала транскрибируются в виде больших предшественников. Так как гены тРНК часто образуют кластеры, такие первичные транскрипты могут содержать более чем один вид тРНК. Последовательность предшественника тирозиновой тРНК приведена на рис. 26.8.

Предшественник двух тРНК (пролиновой и сериновой), кодируемых генами бактериофага Т4 (гл. 28), является примером предшественника, содержащего две различные тРНК. Возможно, что все восемь генов тРНК, кодируемых ДНК этого вируса, транскрибируются в виде одного длинного полинуклеотида, который вначале расщепляется на димерные предшественники, а затем идет созревание каждого из них с образованием двух зрелых молекул тРНК. Хотя гены тРНК *E. coli* включают ССА-последовательность на 3'-конце тРНК, у генов тРНК фага Т4 такой последовательности нет. В этом случае ССА-последовательность достраивается посттранскрипционно с помощью специфической *тРНК-СМР-АМР-пирифосфорилазы*, которая поставляется клеткой-хозяином.

спейсер. Хотя для предшественников тРНК эукариот получены некоторые сведения, неизвестно, какая часть повторяющихся блоков или кластеров на самом деле транскрибируется.

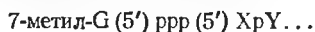
26.5.4.3. Информационная РНК

В некоторых случаях трансляция мРНК *E. coli* начинается с 5'-конца до завершения транскрипции. Следовательно, они не подвергаются созреванию перед трансляцией. Однако было обнаружено, что некоторые полигенные фаговые транскрипты подвергаются расщеплению с образованием нескольких небольших мРНК. Нуклеазой, которая проводит это расщепление, оказалась РНаза III, фермент, ответственный за созревание предшественников рибосомных РНК (разд. 26.5.4.1).

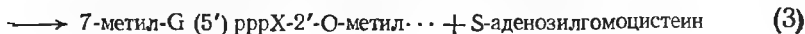
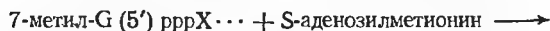
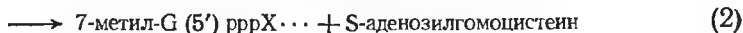
Обнаруженные в цитоплазме эукариотических клеток мРНК монокленны и относительно коротки (средняя длина ~2000 нуклеотидов). В отличие от этого ядерная РНК, которая, скорее всего, является первичным транскриптом, часто гораздо длиннее, чем цитоплазматическая РНК, и быстрее обращается. Ее называют *гетерогенной ядерной РНК*. Только небольшая часть ядерной РНК поступает в цитоплазму как мРНК.

Большая часть молекул мРНК содержит полиадениловые последовательности длиной 100—200 остатков на 3'-конце [«poly (A)-хвосты»]. Полиадениловые последовательности обнаружены также у многих ядерных РНК. Поэтому возможно, что мРНК возникают из ядерных РНК в результате утраты последовательностей у 5'-конца. Полиадениловые последовательности добавляются к этим РНК после транскрипции, вероятно, с помощью *полиаденилатполимеразы*, которая была обнаружена во многих эукариотических клетках.

У мРНК эукариот модифицирован также 5'-конец, который содержит так называемый «кеп», состоящий из 7-метилгуанилата, присоединенного пиррофосфатной связью к 5'-концу мРНК:



где X и Y — нуклеозидные группы на 5'-конце мРНК — могут содержать 2'-О-метильную группу. Предполагается, что синтез 5'-кепа идет следующим образом:



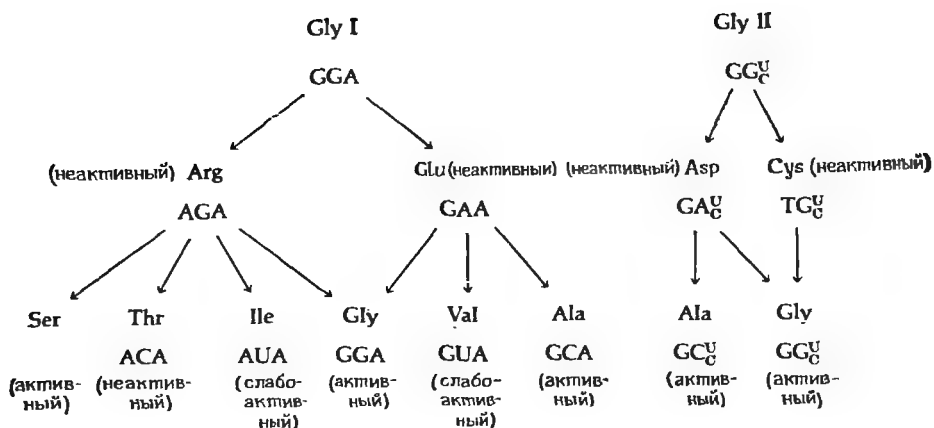


Рис. 26.9. Аминокислотные замещения двух глициновых остатков Gly I и Gly II, которые критичны для образования активной триптофансинтетазы. Соответствующие триплеты мРНК выведены на основе известных кодонов для этих аминокислот, отличающихся по одному основанию. Кодоны Gly I и Gly II различаются, так как дают различные замещения. Третье основание в кодоне Gly II может быть U или C. Термины *активный*, *слабоактивный* и *неактивный* относятся к ферменту, образуемому в этом штамме. (Из работ Яновского с сотр.)

3'-Полиадениловые последовательности и 5'-кепы могут служить защитой для мРНК от их расщепления нуклеазами. В некоторых случаях 5'-кепы оказались необходимыми для присоединения рибосом при трансляции.

26.5.5. Коллинеарность генетической карты и аминокислотной последовательности

В предыдущем изложении в основу было положено предположение о том, что последовательность нуклеотидов в ДНК коллинеарна последовательности аминокислот в белках. Это основопологающий тезис можно проиллюстрировать, анализируя соотношение ген — белок на примере α -цепи триптофансинтетазы *E. coli*.

Известно много мутантов *E. coli*, у которых изменена активность α -субъединицы триптофансинтетазы. Этот белок, так же как и множество его неактивных вариантов, был выделен в чистом виде и для него были определены аминокислотные замены. Такие мутанты легко обнаружить благодаря появлению зависимости роста бактерий от триптофана (неактивен α -белок).

В пептиде, полученном из α -белка, Gly I замещен на Glu или Arg (рис. 26.9). Фермент с любой из этих замен совершенно неактивен. Рекомбинация путем кроссинговера обоих мутантов приводит к появлению активного фермента дикого типа, содержащего

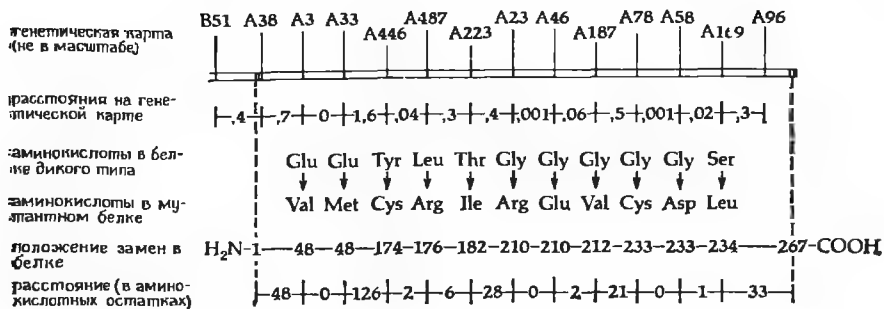


Рис. 26.10. Генетическая карта гена А триптофансинтетазы и соответствующие аминокислотные замены в белке, иллюстрирующие коллинеарность. Положение этих замен в аминокислотной последовательности также указано. Обозначения на верхней линии (B51 и т. д.) — экспериментальные обозначения мутантов, в которых были обнаружены специфические изменения. (Yanofsky C., Drapeau G. R., Guest J. R., Carlton B. C., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 57, 296, 1967.)

Gly. Это указывает на то, что в двух мутантах в кодоне Gly изменены разные основания. Поэтому и возможно возникновение исходного кодона в результате рекомбинации. Мутации кодонов Gly и Arg приводят к дальнейшим аминокислотным заменам (рис. 26.9). Так как точечные мутации кодонов I и II приводят к различным аминокислотным заменам, то, следовательно, эти кодоны также различны. Предполагаемые кодоны для всех аминокислотных замен приведены на рис. 26.9.

Если положение Gly I занимает остаток небольшой нейтральной аминокислоты Gly, Ala или Ser, то фермент сохраняет активность. Если в этом положении находятся остатки Thr, Ile или Val, то активность мала, но активность полностью исчезает, если в этом положении находятся ионизируемые остатки Arg или Glu.

Детальное генетическое картирование мутантов по гену α -белка триптофансинтетазы наряду с изучением первичной структуры белка показало строгую коллинеарность аминокислотной последовательности и генетической карты. Была определена также последовательность нуклеотидов, соответствующая первым 120 аминокислотным остаткам α -белка, что как и ожидалось, также подтвердило коллинеарность аминокислотной последовательности и нуклеотидной последовательности соответствующего гена (рис. 26.11). Соотношение мест мутаций, аминокислотной последовательности и замещений в α -белке триптофансинтетазы показано на рис. 26.10.

Из коллинеарности гена (ДНК) и аминокислотной последовательности, а также известной последовательности рибонуклеотидов,

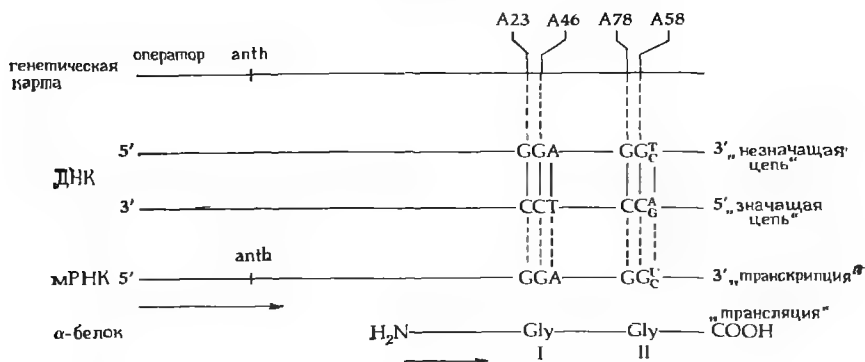


Рис. 26.11. Схема коллинеарности нуклеотидных последовательностей ДНК триптофанового оперона, мРНК и аминокислотной последовательности α -белка. Картирование мутантов по Gly I и Gly II и различных рекомбинантов позволило связать генетическую карту к аминокислотной последовательности белка. Операторный участок находится со стороны гена антрапилатсинтетазы (anth). Транскрипция мРНК и синтез белка также начинаются в этом районе и идут направо. (Guest J. R., Yanofsky C., Nature, 210, 799, 1966.)

составляющих код, и направления синтеза мРНК (разд. 26.5.2) и белка (разд. 26.3.1) были выведены соотношения, показанные на рис. 26.11. Коротко суммируя, мРНК синтезируется, начиная от 3'-конца той цепи ДНК, которая служит в качестве матрицы, и синтезируется антипараллельная (комплементарная) последовательность. В результате транскрипции образуется такая последовательность мРНК, которая идентична таковой для цепи ДНК с 5'-концом на этой схеме, за исключением замены U на T в последней. Белок синтезируется с N-конца путем переноса по одному аминокислотному остатку с соответствующей аминоацил-тРНК, антикодон которой комплементарен и антипараллелен триплету кодона мРНК.

26.5.6. Молекулярная генетика гемоглобина

Молекулярная генетика гемоглобина наглядно иллюстрируется результатами изучения некоторых врожденных аномалий гемоглобина и детально обсуждается в гл. 31. Большая часть гемоглобиновых мутаций включает изменение одного аминокислотного остатка. Например, у гемоглобина HbS (серповидно-клеточный гемоглобин) остаток валина замещен на остаток глутаминовой кислоты в уникальном положении β -цепи (гл. 31). Другие мутации вызывают сдвиг рамки считывания (Hb_{Wayne}) либо делецию всего или большей части гена (α^0 -талассемия). Каждая из них будет обсуждаться ниже. Физиологические последствия таких мутаций рассмотрены в гл. 31.

26.5.6.1. Аминокислотные замещения

Как отмечено выше, большинство аномальных гемоглобинов является результатом миссенс-мутаций (мутаций, приводящих к искажению информации, см. выше) в структурных генах α - или β -цепей глобина. Более 80 различных замещений аминокислот идентифицировано в настоящее время только в β -цепи. Некоторые из аномальных гемоглобинов, для которых были определены такие замещения, приведены в табл. 31.1. В каждом случае образование вариантного гемоглобина обусловлено точечной мутацией, которая наследуется по закону Менделя; гены α - и β -цепей расположены в различных хромосомах.

Часть нуклеотидной последовательности мРНК α - и β -цепей приведена в табл. 26.5. Сопоставление аминокислотной последовательности нормального HbA с последовательностью нуклеотидов в мРНК и возможными кодонами (табл. 26.1) для замещенных аминокислот показывает, что отнесение кодонов является однозначным и что нормальные мутанты различаются изменениями единичных оснований. Отсюда очевидно, что человек и микроорганизмы используют один и тот же словарь кодонов и что код на самом деле универсален.

26.5.6.2. Мутанты по терминации цепей

Аномальные гемоглобины, имеющие удлиненные по карбоксильному концу α и β -субъединицы, образуются в результате нарушения терминации полипептидной цепи. Примером этого является вариант Hb_{Constant Spring} (Hb_{Con Spr}), который имеет каждый двадцатый житель Таиланда. Hb_{Con Spr} содержит 31 дополнительный аминокислотный остаток после С-концевого аргинина нормальной α -цепи. Первые 141 остаток идентичны таковым у нормальной α -цепи. мРНК нормальной α -цепи содержит терминирующий кодон UAA в положении, соответствующем 142-му кодону, а у мРНК Hb_{Con Spr} в 142-м положении имеется кодон глутамина. Таким образом, Hb_{Con Spr}, вероятно, обусловлен замещением С на U в UAA-кодоне, что приводит к глутаминовому кодону (CAA) в положении 142 и, следовательно, к трансляции последующего сегмента мРНК, который обычно не транслируется.

Hb_{Icaria} и Hb_{Koya Dora} аналогичны Hb_{Con Spr}, за исключением аминокислоты в положении 142, которая у Hb_{Icaria} является лизинном, а у Hb_{Koya Dora} — серином. Кодоны этих аминокислот, также как и для глутамина, отличаются от UAA по одному основанию. Рис. 26.12 иллюстрирует эти соотношения.

Удлиненная цепь Hb_{wayne} содержит восемь дополнительных аминокислотных остатков — от 139 до 146, что уникально и не обнаружено ни у нормальной цепи, ни у α , α _{Con Spr}, α _{Icaria} или

Таблица 26.5

Сопоставление нуклеотидной последовательности мРНК
 α - и β -цепей глобина с аминокислотной последовательностью этих цепей^a

Последовательность						Цепь
136 Leu XX(G)	137 Thr ACC	138 Ser UCC	139 Lys AAA	140 Tyr UAC	141 Arg CG(U)	α
79 Asp (G)AC	80 Asn AAC	81 Leu CUC	82 Lys AAG	83 Gly (G)XX		β
115 Ala (G)CC	116 His CAU	117 His CAC	118 Phe UUU	119 Gly G(G)X		β
144 Lys AA(G)	145 Tyr UAU	146 His CAC	CT UAA	G(C)X		β
56 Gly (G)GC	57 Asn AAC	58 Pro CCU	59 Lys AAG	60 Val (G)XX		β
101 Glu XX(G)	102 Asn AAC	103 Phe UUC	104 Arg AG(G)			β
123 Ala (G)CC	124 Ser UCA	125 Leu CUU	126 Asp G(A)X			α
83 Gly X(G)C	84 Thr ACC	85 Phe UUU	86 Ala GXX			β
86 Ala (G)CC	87 Thr ACA	88 Leu CUG	89 Ser (A)XX			β
138 Ala (G)CU	139 Asn AAU	140 Ala GXX				β

^a X — неизвестный нуклеотид в кодоне. Цифры над последовательностями отражают положение аминокислотного остатка в α - или β -цепи глобина. CT — кодон терминации. Нуклеотиды, взятые в скобки, определены неоднозначно. (Forget G. B., Marotta C. A., Weissman S. M., Verma I. M., McCaffrey R. P., Baltimore D., Ann. N. Y. Acad. Sci., 241, 290, 1974.)

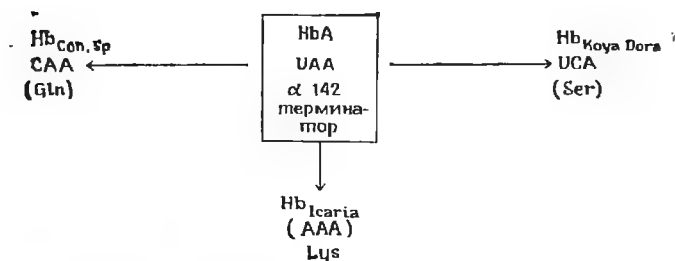


Рис. 26.12. Отличия гемоглобинов Hb_{Con Spr}, Hb_{Icaria}, Hb_{Koza Dora} и HbA.

α_{Koza Dora}. Аминокислотную последовательность и длину Hb_{Wayne} можно объяснить делецией U в кодоне 138 и последующим сдвигом рамки считывания. Кодон 147 в сдвинутой рамке, UAG, является кодоном терминирования (рис. 26.13).

Таким образом, удлиненные по карбоксильному концу α- и β-глобины возникают либо в результате замены оснований в нормальном терминирующем UAA-кодоне, либо в результате делеции до терминирующего кодона, приводящей к сдвигу рамки считывания. При этом трансляция продолжается до тех пор, пока не будет достигнут следующий терминаторный кодон.

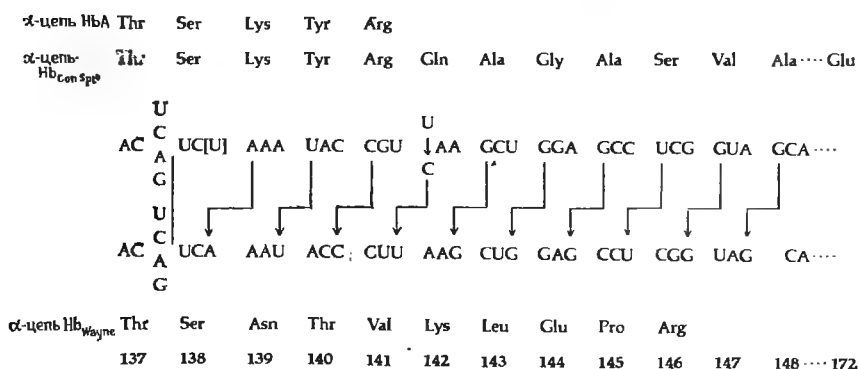


Рис. 26.13. Мутации со сдвигом рамки в гемоглобине Hb_{Wayne}. Показаны частичные аминокислотные и нуклеотидные последовательности α-цепей гемоглобинов HbA, Hb_{Con Spr} и Hb_{Wayne}. Нуклеотидная последовательность кодонов 138 и 139 показана условно. Делеция любого из четырех нуклеотидов перед кодоном 140 приводит к нуклеотидной последовательности, которая определяет аминокислотную последовательность со стороны С-конца, характерную для α-цепи гемоглобина Hb_{Wayne}. Третье основание кодона Ser 138 делетировано; таким образом однозначно определена последовательность оснований в α-цепи мРНК от кодона 140 до второго основания в кодоне 148. (Weatherall D. J., Clegg J. B., Annu. Rev. Genet., 10, 157, 1976.)

26.5.6.3. Талассемии

В норме скорости синтеза α - и β -цепей гемоглобина должны быть практически одинаковы. *Талассемия* характеризуется уменьшением скорости синтеза одной или нескольких глобиновых цепей. Следствием такого дисбаланса образования глобиновых цепей является выпадение в осадок избыточных цепей, понижение уровня гемоглобина и выживаемости красных кровяных телец. При *α -талассемии* не хватает α -цепей, и поэтому в осадок выпадают β -цепи: при *β -талассемии* наблюдается обратная ситуация. При α^0 - и β^0 -талассемиях соответствующие цепи вообще не образуются, а при α^+ - и β^+ -талассемиях α - и β -цепи образуются в меньших количествах.

α^0 -Талассемия возникает в результате делеции в α -глобиновом гене. У гомозигот по α^0 -талассемии наблюдается синдром, известный как *водянка плода*. Эти особи не синтезируют α -глобиновые цепи и обычно погибают до или вскоре после рождения. В клетках этих особей не обнаруживается мРНК α -глобина — РНК из этих клеток не вызывает синтеза α -глобиновых цепей *in vitro* в присутствии рибосом и других компонентов системы трансляции, хотя эта РНК вызывает синтез β -глобиновых цепей.

ДНК, комплементарная к α -глобиновой мРНК (кДНК), может быть синтезирована с помощью вирусной обратной транскриптазы (гл. 25) на глобиновой мРНК из нормальных клеток человека как матрице. α -Глобиновая кДНК может затем быть использована в гибридизационных экспериментах (гл. 25) для обнаружения α -глобиновой последовательности в клеточной ДНК. Гибридизацию α -глобиновой кДНК с ДНК из клеток гомозигот обнаружить не удается, хотя с β -глобиновой кДНК эта ДНК гибридизуется в нормальном количестве. Таким образом, α -глобиновый ген в значительной мере или полностью делетирован у особей с α^0 -талассемией. Для глобина имеются два смежных гена, но оба делетированы у гомозигот по α^0 -талассемии. Мягкая форма талассемии возникает в том случае, когда делетирован только один из двух генов α -глобина.

У особей, которые являются гомозиготами по β^0 -талассемии, нет β -глобина, хотя β -ген имеется в геноме, как свидетельствует гибридизационный тест. Однако, когда клеточную ДНК особей с β^0 -талассемией добавляют к рибосомам и остальным компонентам системы трансляции, синтезируется только α -, но не β -глобин. Таким образом, в этом случае мРНК для β -глобина либо не синтезируется, либо синтезируется, но не транслируется.

26.6. Контроль синтеза белков

Некоторые ферменты присутствуют в клетке в большом количестве, а другие — в малом, хотя они одинаково представлены в

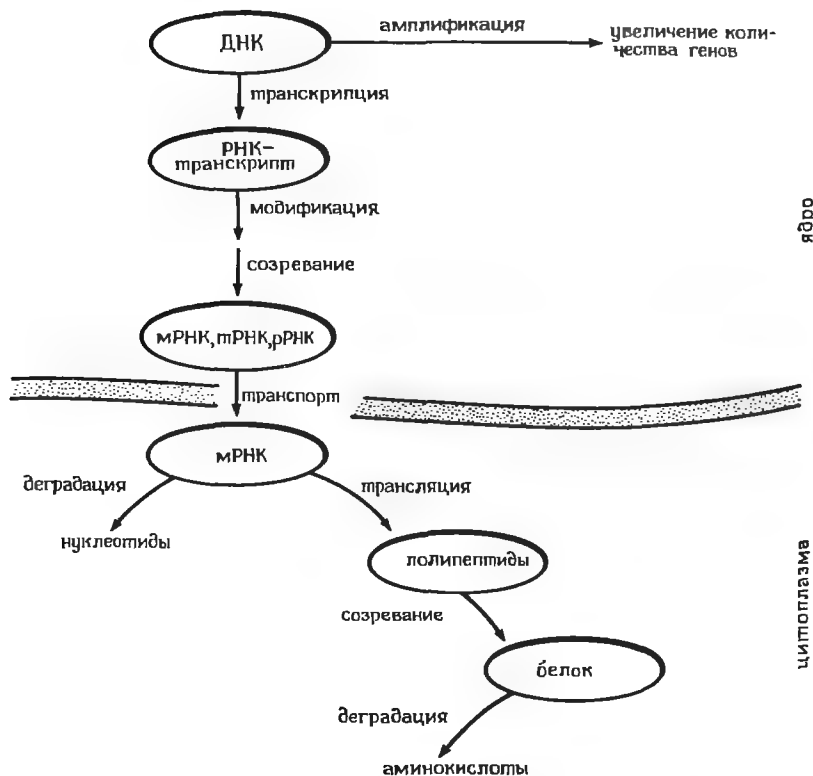


Рис. 26.14. Стадии экспрессии гена, на которых может быть регуляция.

геноме. Более того, эритроциты содержат огромное количество гемоглобина, а фибробласты — коллагена, хотя все клетки одного организма содержат ту же самую генетическую информацию. В связи с этим весьма интересно установить, какие генетические или иные факторы регулируют внутриклеточную концентрацию различных белков. Большая часть информации по этому поводу была получена при исследованиях на микроорганизмах, но менее подробные исследования на системах млекопитающих свидетельствуют о том, что и в этом случае работают аналогичные факторы.

Регуляция экспрессии гена может осуществляться на любой или на нескольких стадиях на пути от гена до полипептидного продукта (рис. 26.14). Среди этих возможностей, наиболее изучена модуляция частоты транскрипции, контролирующая скорость синтеза полипептидов. Частота транскрипции определенной последовательности кодонов в большинстве случаев зависит от частоты инициации на промоторном участке. Ярким примером является регуляция ге-

нов, контролирующих ферменты метаболизма лактозы *E. coli*. Эти гены расположены на хромосоме один за другим и образуют координированно регулируемую единицу, так называемый оперон. Один из контролирующих элементов — оператор — расположен на 5'-конце оперона и является местом, с которым связывается репрессор (разд. 26.6). Второй регуляторный элемент — промотор — непосредственно примыкает к оператору и, как было отмечено ранее (разд. 26.5.2.1), является местом связывания РНК-полимеразы.

26.6.1. Лактозный оперон

Анализ лактозного оперона *E. coli* показал, что он является единым транскрибируемым участком, состоящим из примерно 5420 нуклеотидов, содержащий промотор-операторный участок из 122 нуклеотидов, за которыми следуют последовательности (*структурные гены*), кодирующие β -галактозидазу, галактозидпермеазу и тиогалактозидтрансацилазу (рис. 26.15). β -Галактозидаза катализирует гидролиз β -галактозидов, включая лактозу; пермеаза контролирует скорость поступления β -галактозидов в клетку *E. coli*. Функции трансацилазы неизвестны.

В присутствии лактозы или других галактозидов, называемых *индукторами*, скорость синтеза полипептидов, кодируемых лактозным опероном, может быть увеличена более чем в 10^3 раз. Этого не происходит, если одновременно с индукторами присутствует

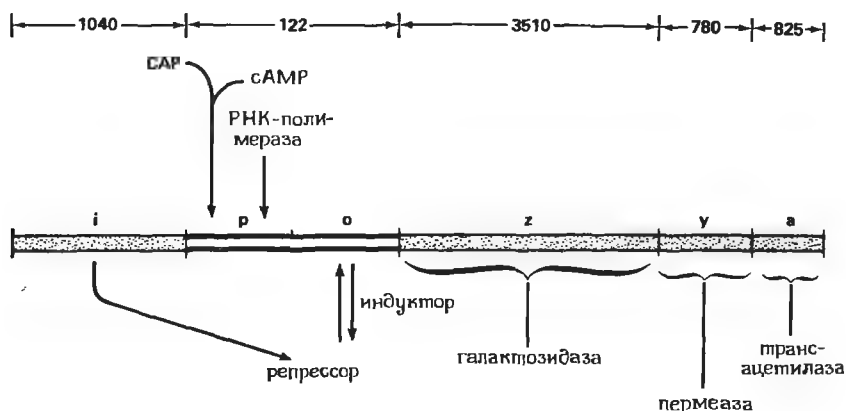


Рис. 26.15. *lac*-Оперон *E. coli*. Промоторный (p) и операторный (o) участки сильно увеличены. Цифры в верхней части рисунка показывают количество пар оснований в каждом участке оперона. *i* — ген *lac*-репрессора, *z* — β -галактозидазы, *y* — галактозидпермеазы, *a* — тиогалактозид-трансацилазы. (Dickson R. C., Abelson J., Barnes W. M., Reznikoff W. S., Science, 187, 27, 1975. Copyright © 1975 by the American Association for the Advancement of Science.)

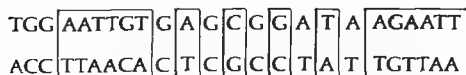


Рис. 26.16. Часть нуклеотидной последовательности *lac*-оперона. Показаны участки с осью симметрии второго порядка. (Gilbert W., Maxam A., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 70, 3581, 1973.)

глюкоза. Таким образом, глюкоза ингибирует индуцированный синтез ферментов катаболизма лактозы. Поэтому можно полагать, что лактозный оперон создан для того, чтобы способствовать использованию лактозы в качестве вторичного источника углерода и энергии после израсходования глюкозы в среде.

Как было отмечено выше, скорость синтеза полипептидов, кодируемых лактозным опероном, контролируется регуляцией частоты инициации транскрипции. Это происходит следующим образом. Для инициации транскрипции необходимы как холофермент РНК-полимеразы, так и белок, называемый CAP (*катаболитный активатор*), который должен содержать связанный сАМР. Связывание CAP—сАМР-комплекса с CAP-участком промоторной области оперона является неперенным условием образования открытого комплекса РНК-полимеразы с промотором (рис. 26.15). Количество комплекса CAP—сАМР определяется концентрацией сАМР, которая уменьшается при увеличении концентрации глюкозы. Если концентрация комплекса CAP—сАМР падает ниже определенного уровня, РНК-полимераза не может образовать открытый комплекс с промоторным участком, необходимый для инициации транскрипции. Поэтому присутствие глюкозы предотвращает транскрипцию лактозного оперона. Даже при высокой концентрации сАМР, которая существует в отсутствие глюкозы (такая концентрация, которая достаточна для того, чтобы CAP-участки были заняты комплексом CAP—сАМР), образование открытого комплекса РНК-полимеразы с промотором предотвращается другим белком — *lac*-репрессором, если он связан с операторным участком. Этот участок расположен между промотором и геном β -галактозидазы, хотя, повидимому, он частично перекрывается с промотором (рис. 26.15). *lac*-Репрессор состоит из четырех идентичных субъединиц с *M* по 37 000 каждая. Связывание тетрамера с операторным участком предотвращает связывание РНК-полимеразы. Каждая субъединица тетрамера содержит также участок для связывания индуктора, например, β -галактозида. Если эти участки заняты индуктором, репрессор не может связаться с операторным участком ДНК. Следовательно, индукторы освобождают операторный участок, после чего РНК-полимераза может иницировать транскрипцию.

Для сегмента из 35 пар оснований (~12 нм) в операторном участке характерна вращательная симметрия второго порядка (часть этой последовательности приведена на рис. 26.16). Тетрамер

lac-репрессора представляет собой гантель размерами $4,5 \times 6 \times 13-14$ нм. Такая фигура обладает тремя осями симметрии второго порядка. Длинная ось репрессора может быть ориентирована параллельно оси спирали ДНК, что приведет к совпадению оси симметрии второго порядка тетрамера с осью симметрии оператора (рис. 26.17).

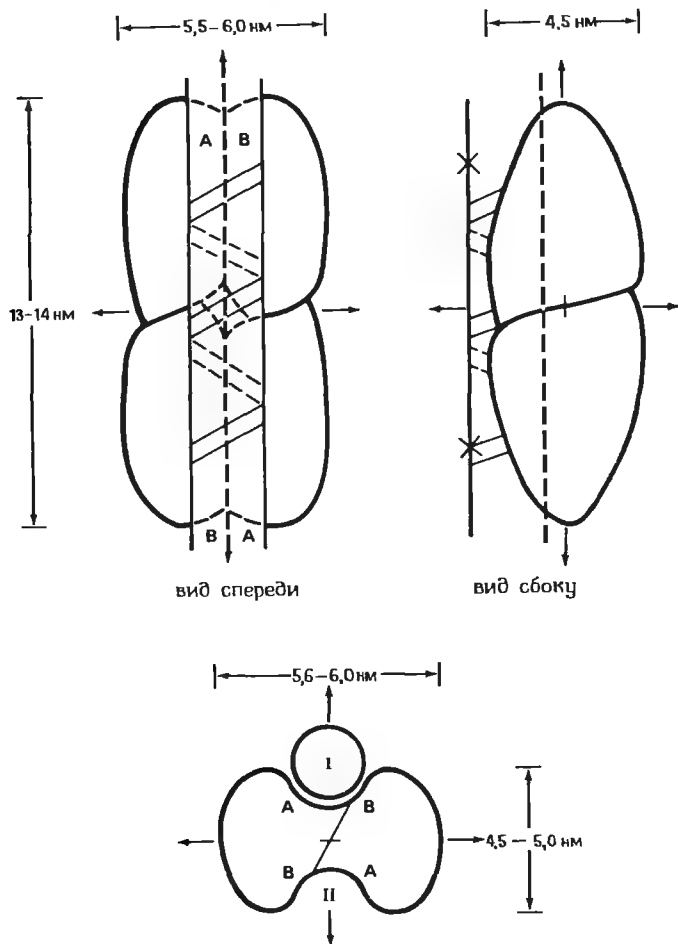


Рис. 26.17. Тетрамер *lac*-репрессора и возможный характер его взаимодействия с оператором. Каждая из четырех субъединиц имеет две различные поверхности — А и В, которые могут взаимодействовать с ДНК, что дает возможность оператору связывать репрессор двумя участками (I и II). Все размеры на рисунке даны в нанометрах. (Steitz T. A., Richmond T. J., Wise D., Engelman D., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 71, 593, 1974.)

Мутации оператора или структурного гена репрессора могут предотвратить связывание репрессора с оператором, что приведет к нерегулируемой экспрессии (транскрипции) оперона, к так называемой *конститутивной экспрессии*. Мутации репрессора могут также предотвратить связывание индуктора с репрессором, что сделает репрессию необратимой, т. е. экспрессия оперона станет неиндукцибельной. Мутации, которые предотвращают синтез сАМР или изменяют САР, предотвращают транскрипцию лактозного и других оперонов, выводя таким образом экспрессию этих оперонов из-под контроля метаболическим состоянием клетки. В связи с этим очевидно, что модуляция инициации транскрипции лактозного оперона может быть обусловлена синергическим действием двух низкомолекулярных соединений — сАМР и β -галактозида, которые вызывают изменение состояния промотора путем воздействия на два белка — САР и *lac*-репрессор.

26.6.2. Триптофановый оперон

E. coli может регулировать скорость синтеза ферментов, необходимых для биосинтеза триптофана, в ответ на изменение внутриклеточной концентрации триптофана. При росте в присутствии избытка триптофана количество фермента составляет всего около 5% того уровня, который наблюдается при росте бактерий в среде без триптофана, т. е. когда триптофан должен быть синтезирован клеткой. Таким образом, в этом и аналогичных случаях *E. coli* отвечает на состав питательной среды включением или исключением соответствующих ферментов биосинтеза. Для триптофана это достигается транскрипционным контролем триптофанового (*trp*) оперона.

Так же, как и лактозный оперон, триптофановый оперон *E. coli* представляет собой единый транскрипционный участок, определяющий структуру пяти полипептидов, которые катализируют реакции, необходимые для биосинтеза триптофана (рис. 26.18). Интактная триптофановая мРНК состоит из примерно 7 000 нуклеотидов и содержит лидерную последовательность из 166 нуклеотидов, предшествующую последовательностям, которые кодируют полипептидные продукты оперона. Регуляторный промотор-операторный участок предшествует и частично перекрывается с участком инициации транскрипции и определяет возможность для РНК-полимеразы инициировать транскрипцию этого оперона. Однако в отличие от *lac*-репрессора триптофановый репрессор не может связаться с оператором до тех пор, пока присутствует *корепрессор* — триптофан. Таким образом, в отсутствие триптофана триптофановый репрессор не может связаться с оператором, и клетка полностью *dereпрессирована*. В этом случае транскрипция и, следовательно, трансляция триптофанового оперона идут с максимальной ско-

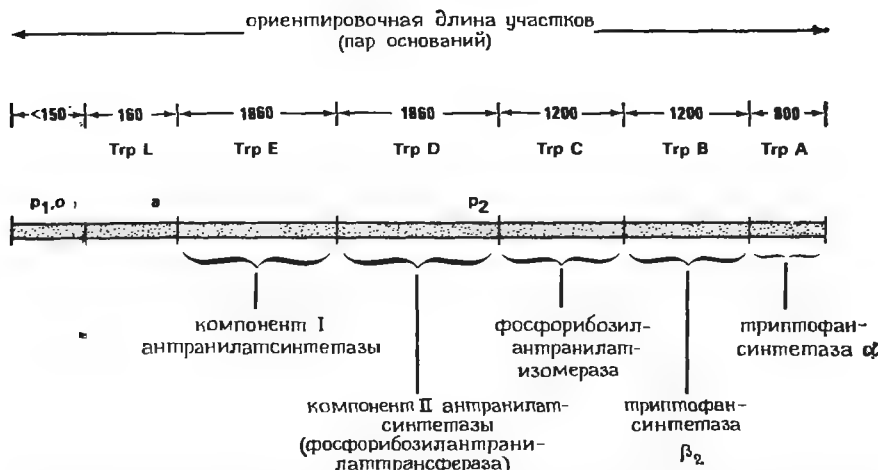


Рис. 26.18. *Trp*-оперон *E. coli*, показывающий длину нуклеотидной последовательности и полипептидных продуктов структурных генов. p_1 и α обозначают главные промотор и оператор, α — аттенуатор и p_2 — низкоэффективный внутренний промотор. (Bertrand K., Korn L., Lee F., Platt P., Vanofsky C., Science, 189, 22, 1975. Copyright 1975 by the American Association for the Advancement of Science.)

ростью. В присутствии триптофана клетка находится в *репрессированном* состоянии. Репрессор при этом связан с оператором и вследствие этого синтез ферментов биосинтеза триптофана *координированно репрессирован* и их содержание в клетке понижается.

В дополнение к промотор-операторной области триптофановый оперон содержит второй регуляторный участок — аттенуаторный; эта последовательность расположена после участка инициации транскрипции, но предшествует первому структурному гену. Второй регуляторный участок может работать как специальный сигнал терминции, который определяет, какая часть молекул РНК-полимеразы, начавших транскрипцию триптофанового оперона, закончит этот процесс. Аналогичные аттенуаторные последовательности могут существовать и в других оперонах.

26.6.3. Синтез гена тирозиновой супрессорной тРНК

Разработка методов химического синтеза коротких (от 8 до 15 нуклеотидных остатков) олигодезоксирибонуклеотидов и их ферментативного лигирования (сшивания) позволило осуществить полный синтез гена, который кодирует тирозиновую супрессорную тРНК *E. coli*.

Первичный продукт этого гена содержит 126 нуклеотидов; однако этот полинуклеотидный предшественник претерпевает ферментативное расщепление с образованием зрелой тРНК, которая



Рис. 26.19. Нуклеотидная последовательность ДНК, соответствующей гену супрессорной тирозиновой тРНК *E. coli*. Промоторная последовательность простирается от —56 до 1 остатка, предшественник тРНК — от 1 до 126 остатков и терминаторная последовательность — от 126 до 151 остатка. (Courtesy of professor H. G. Khorana.)

состоит из 86 нуклеотидов (рис. 26.8). Остальная часть гена состоит из промоторного участка длиной 56 остатков на одном конце и терминаторного участка длиной 25 остатков на другом конце. Таким образом, функциональный ген тирозиновой тРНК, полный синтез которого был осуществлен, представляет собой двухнитевой дуплекс ДНК длиной 207 нуклеотидов (рис. 26.19). Его полная нуклеотидная последовательность была установлена сначала в результате определения первичной структуры предшественника тРНК, а затем определением последовательности дезоксирибонуклеотидов регуляторных элементов (промоторного и терминаторного участков).

Стратегия, использованная при синтезе части гена, кодирующей предшественник тРНК, включает три основные стадии:

1. Химический синтез коротких дезоксирибонуклеотидных фрагментов, соответствующих обоим нитям дуплексной ДНК. Синтез этих олигонуклеотидов проводится либо постадийной полиме-

ризацией мононуклеотидов, либо конденсацией коротких (ди-, три- и тетра-нуклеотидов) олигонуклеотидных фрагментов с образованием олигонуклеотидных цепей необходимой длины. Для этой цели используется несколько конденсирующих агентов; наиболее эффективными оказались карбодиимиды (гл. 6) и сульфонилхлориды. Так как эти реагенты легко реагируют с различными группами нуклеотидов (3'- и 5'-гидроксидные группы дезоксирибозы, аминогруппы гетероциклических оснований, фосфатные группы), то были разработаны подходящие защитные группы для предотвращения изменений этих реакционноспособных групп. Такими группами являются тритильная и *n*-метокситритильная для защиты 5'-гидроксидной группы, бензоильная и анизоильная группы для защиты экзоциклической аминогруппы цитозина. Стадии, необходимые для синтеза тринуклеотида pArArC, приведены на рис. 26.20.

2. Одновременное сшивание нескольких фрагментов с помощью ДНК-лигазы. В каждом случае фрагменты выбирают таким образом, чтобы оставались комплементарные одонитевые концы, позволяющие сплавление коротких дуплексов друг с другом в нужной последовательности и последующее ферментативное лигирование.

3. Связывание дуплексов, опять за счет одонитевых перекрытий концов, с образованием дуплекса ДНК, соответствующего предшественнику тирозиновой тРНК (рис. 26.21). Завершение гена осуществлено в результате синтеза промоторной и терминальной последовательностей и их слияния по соответствующим концам в структурную часть молекулы, содержащую 126 нуклеотидов.

Синтетический ген супрессорной тирозиновой тРНК полностью активен после включения в бактериофаг λ , содержащий *нонсенс*-

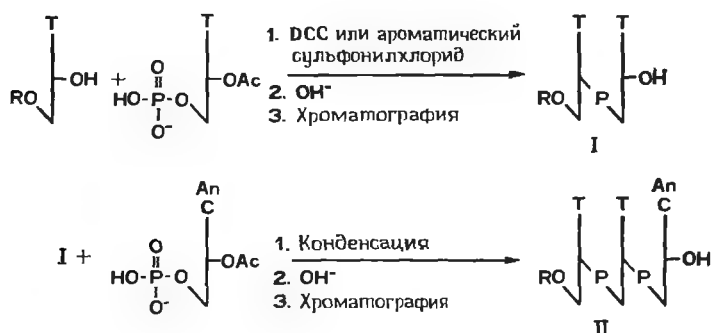


Рис. 26.20. Стадии химического синтеза тринуклеотида d-pTpTpC. Обозначения: Ac — ацетил; An — анизоил; C — цитозин; DCC — дициклогексилкарбодинмид; R — тритил; T — тимин. (Khoraha H. G., Proc. 7th Int. Cong. Biochem., Tokyo, 1967.)

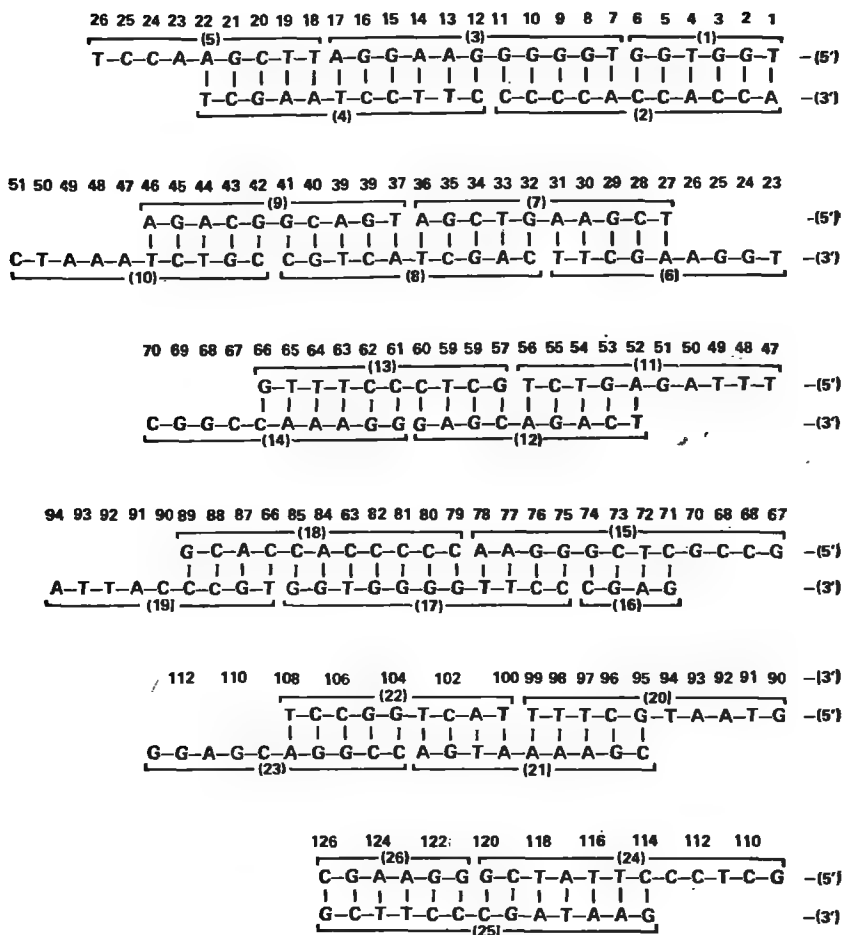


Рис. 26.21. Расположение 26 олигодезоксирибонуклеотидных фрагментов, синтезированных химически для полного синтеза ДНК, соответствующей предшественнику тирозиновой супрессорной тРНК *E. coli*. (Khorana H. G. et al., J. Biol. Chem., 251, 565, 1976.)

мутацию (разд. 26.4.3.1), что подтверждается восстановлением способности мутантного бактериофага размножаться в соответствующей клетке-хозяине.

26.6.4. Контроль белкового синтеза у эукариот

Несмотря на то что здесь были рассмотрены регуляторные гены и репрессорные механизмы микроорганизмов, можно предполагать,

что они существуют также и у более сложных организмов. Дифференцированные клетки многоклеточных организмов синтезируют существенно различные количества разных белков, несмотря на идентичность заложенной в них генетической информации. Явления индукции и репрессии могут быть причиной некоторых различий в скоростях метаболических превращений и относительной важности различных метаболических путей для клеток различной дифференцировки из одного организма.

Имеются некоторые указания на последовательное образование ряда белков. На некоторых специфических областях хромосом, видимых как пуффы, РНК синтезируется в определенной временной последовательности во время эмбрионального развития или при стимуляции *экдизоном* (разд. 3.4.5.7), одним из гормонов насекомых. Примером контроля синтеза белка во время эмбрионального развития может служить то, что некоторые неиндуцибельные белки не обнаруживаются на ранних стадиях развития, но появляются на поздних. Так, у эмбрионов имеется либо только фетальный гемоглобин ($HbF = \alpha_2\gamma_2$), либо с небольшой примесью $HbA (\alpha_2\beta_2)$. Это свидетельствует о том, что β -цепь не синтезируется с заметной скоростью. У новорожденных образование γ -цепи репрессировано и ускорено образование β -цепи (гл. 31).

Хотя для понимания механизма белкового синтеза основные данные были до сих пор получены для прокариот, в случае эукариот работают те же основные принципы и аналогичные участники. С другой стороны, регуляция белкового синтеза у эукариот гораздо сложнее, чем у прокариот. В связи с тем что геномы эукариот очень велики и содержат высокоповторяющиеся и умеренноповторяющиеся последовательности, возникает принципиальный вопрос — должна ли РНК-полимераза и регуляторные молекулы просматривать всю последовательность огромного генома для того, чтобы найти соответствующую мишень, либо имеются специфические механизмы, например структурные вариации хроматина, которые ограничивают область такого поиска? Кроме того, места транскрипции и трансляции у эукариот физически разделены в клетке. Наконец, есть много оснований предполагать, что для широкой дифференциации клеток, характерной для высших эукариот, необходима сложная иерархия взаимосвязанных регуляторных реакций.

Первичными регуляторами многих метаболических процессов у млекопитающих являются гормоны. Многие гормоны, включая инсулин, тестостерон, тироксин, гормоны роста (соматотропин) и адренокортикальные стероиды, при введении *in vivo* существенно изменяют скорость синтеза белков, причем не только в специфических тканях. Некоторые из этих гормональных эффектов весьма быстры — через два часа после инъекции крысам адренокортикальных стероидных гормонов наблюдается значительное увеличение

активности и количества печеночной тирозин-глутамат-аминотрансферазы. Влияние гормонов на синтез белка проявляется не только в изменении количества различных белков после инъекции специфического гормона, но и в синтетической активности бесклеточной системы, полученной из тканей этого животного. Данные исследований последнего типа лежат в основе предположения о том, что некоторые гормоны, например тироксин и адренокортикальные гормоны, проявляют свое влияние через изменение скорости синтеза РНК, включая гетерогенную ядерную РНК. Это сопровождается изменением активности РНК-полимеразы и количества шероховатого эндоплазматического ретикулума, обнаруживаемого в клетках-мишенях при электронной микроскопии. Эти данные указывают на то, что эффективные гормоны могут: 1) некоторым образом изменять степень функционирования генома как матрицы в системе синтеза РНК и/или 2) изменять скорость переноса аминоксил-ТРНК на рибосомы и включение аминокислот в белки (гл. 41).

ДНК клеток эукариот полностью ассоциирована с гистонами и другими белками (гл. 25). Хотя точная роль этих белков до сих пор неизвестна, было предположено, что гистоны служат не только для защиты ДНК, как белки оболочки многих вирусов, но также, возможно, выполняют некоторые регуляторные функции при транскрипции. Свидетельством в пользу последнего предположения является обнаружение того, что гистоны могут претерпевать обратимые модификации во время периода активного роста или гормональной стимуляции метаболизма (гл. 25).

В семенниках костистых рыб незрелые сперматогонии содержат гистоны, в то время как в зрелой сперме эти белки замещены протаминами (гл. 7). Во время удаления гистонов от ДНК происходит интенсивное ϵ -N-ацетилирование лизиновых остатков и O-фосфорилирование сериновых остатков. Например, у гистона H4, который первым удаляется от ДНК, ацетилируются первые семь лизиновых остатков, а аминоконцевой N-ацетилсерин фосфорилируется с образованием ацетил-O-фосфорилсеринового остатка. Хотя в этом случае удаление гистонов необратимо, есть результаты, свидетельствующие о том, что аналогичные реакции модификации обратимы, а это допускает транскрипцию части ДНК, когда гистоны временно удалены.

26.7. Клеточный цикл

Приведенное выше описание известных механизмов синтеза ДНК, РНК и белков не свидетельствует о том, что эти процессы протекают конкурентно или что все типы клеток имеют одинаковую жизненную историю с точки зрения этих процессов. И на самом деле, изучение различных типов дифференцированных клеток эукариот показывает большие различия их жизненных циклов.

Клетки мышинной гепатомы, растущие в культуре клеток, могут быть индуцированы так, что их деление становится синхронным. Эти клетки проявляют по крайней мере четыре стадии деления: 1) период, предшествующий синтезу ДНК, — от 8 до 10 ч, во время которого идет синтез РНК и белков; 2) период активного синтеза ДНК также длительностью от 8 до 10 ч, во время которого идет конкурентное образование РНК и белков; 3) фаза после окончания синтеза ДНК от 3 до 4 ч, когда продолжается синтез РНК и белков; 4) митоз продолжительностью 1 ч; одновременно хромосомы сокращаются, выстраиваются вдоль нитей веретена и разделяются. В это время синтез ДНК, РНК и белка или очень мал, или вообще не обнаруживается, не удастся также обнаружить полирибосомы. После деления клеток этот цикл, занимающий примерно от 18 до 24 ч, повторяется.

Примером длительного периода, в течение которого не происходит ни синтез ДНК, ни митоз, является развитие крупных ооцитов амфибий перед первым мейотическим делением. Эти клетки остаются на стадии развития, которая может длиться месяцами, когда хромосомы присутствуют в виде длинных нитей ДНК. Во многих местах вдоль нитей ДНК наблюдаются длинные вытянутые нити РНК, синтезированные РНК-полимеразой. Вероятно, эти РНК представлены главным образом молекулами мРНК, которая уже образовалась и готова функционировать, хотя это будет необходимо только после оплодотворения.

Можно привести еще несколько примеров специальных типов жизненного цикла дифференцированных клеток. Нервные клетки млекопитающих у взрослых животных не претерпевают деления и не синтезируют ДНК. Тем не менее эти клетки продолжают активно синтезировать РНК и белки и живут столько же, сколько живет данная особь (гл. 37). Точно так же зрелые лимфоидные клетки не делятся, несмотря на наличие ядра, но они продолжают синтез специфического белка — антитела и функционирование в системе клеточного иммунного ответа (гл. 47). В отличие от них безъядерные эритроциты млекопитающих не имеют ДНК и неспособны синтезировать белки. Несмотря на ограниченную метаболическую способность, эти клетки живут неделями и месяцами в зависимости от ткани (гл. 32). Этих примеров достаточно, чтобы показать большие различия жизненных циклов у специализированных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

- Cantoni G. L., Davis D. R., eds. *Procedures in Nucleic Acid Research*, vols. 1 and 2, Harper and Row, Publishers, New York, 1971.
Cohn W., ed. *Progress in Nucleic Acid Research*, vols. 1—18, Academic Press, Inc., New York, 1963.

- Davidson's *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, rev. by R. P. L. Adams, R. H. Burdon, A. M. Campbell, and R. S. Smellie, 8th ed., Academic Press, Inc., New York, 1977.
- Drake J. W. *The Molecular Basis of Mutation*, Holden-Day, Inc., San Francisco, 1970.
- Garrod A. E. *Inborn Errors of Metabolism*, reprinted with supplement by H. Harris, Oxford University Press, Fairlawn, N. J., 1963.
- Genetic Code, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., vol. 31, 1966.
- Goulian M., Hanawalt P. C., eds. *DNA Synthesis and Its Regulation*, W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif., 1975.
- Hanawalt P. C., Sellow R. B., eds. *Molecular Mechanisms for Repair of DNA*, Plenum Press, New York, 1975.
- Harris H. *The Principles of Human Biochemical Genetics*, 2d ed., American Elsevier Publishing Company, Inc., New York, 1975.
- Hayes W. *The Genetics of Bacteria and Their Viruses*, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1964.
- Ingram V. M. *Biosynthesis of Macromolecules*, 2d ed., W. A. Benjamin, Menlo Park, Calif., 1972.
- Kornberg A. *DNA Synthesis*, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1974.
- Lewin B. *Gene Expression*, vols. 1 and 2, John Wiley and Sons, Inc. New York, 1974.
- Losick R., Chamberlin M., eds. *RNA Polymerase*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1976.
- Mechanism of Protein Synthesis, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., vol. 34, 1969.
- Nomura M., Tissières A., Lengyel P., eds. *Ribosomes*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1974.
- Replication of DNA in Microorganisms, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., vol. 33, 1968.
- Transcription of Genetic Material, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., vol. 35, 1970.
- Watson J. B. *Molecular Biology of the Gene*, 3d ed., W. A. Benjamin, Inc., New York, 1976.
- Wells R. D., Inman R. B., eds. *DNA Synthesis in vitro*, University Park Press, Baltimore, 1972.

Обзорные статьи

- Altman S. Biosynthesis of Transfer RNA in *Escherchia coli*, *Cell*, 4, 21—29, 1975.
- Bertrand K., Korn L., Lee F., Platt T., Squires C. L., Squires C., Yanofsky C. New Features of the Regulation of the Tryptophan Operon, *Science*, 189, 22—25, 1975.
- Burgess R. R. RNA Polymerase, *Annu. Rev. Biochem.*, 40, 711—740, 1971.
- Chamberlin M. J. The Selectivity of Transcription, *Annu. Rev. Biochem.*, 43, 721—775, 1974.
- Chambon P. Eukaryotic Nuclear RNA Polymerases, *Annu. Rev. Biochem.*, 44, 613—638, 1975.
- Crick F. H. C. The Genetic Code, III, *Sci. Am.*, 215, 55—62, 1966.
- Darnell J. E., Jr. The Origin of mRNA and the Structure of the Mammalian Chromosome, *Harvey Lect.*, 69, 1—47, 1973—1974.
- Dickson R. C., Abelson J., Barnes W. M., Beznikoff W. S. Genetic Regulation: The Lac Control Region, *Science*, 187, 27—35, 1975.
- Forget B. The Molecular Basis of Thalassemia, *Crit. Rev. Biochem.*, 2, 311—342, 1974.
- Gefter M. L. DNA Replication, *Annu. Rev. Biochem.*, 44, 45—78, 1975.
- Grossman L., Braun A., Feldberg R., Mahler I. Enzymatic Repair of DNA, *Annu. Rev. Biochem.*, 44, 19—43, 1975.

- Haselkorn R., Rothman-Denes L. B.* Protein Synthesis, *Annu. Rev. Biochem.*, **42**, 397—438, 1973.
- Jacob F., Monod J.* Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins, *J. Mol. Biol.*, **3**, 318—356, 1961.
- Khorana H. G.* Polynucleotide Synthesis and the Genetic Code, *Harvey Lect.*, **62**, 79—105, 1966—1967.
- Khorana H. G., Agarawal K. L., Besmer P., Büchi H., Caruthers M. H., Cashion P. J., Fridkin M., Jay E., Kleppe K., Klepe R., Kumar A., Loewen P. C., Miller R. C., Minamoto K., Panet A., RajBhandary U. L., Ramamoorthy B., Sekiya T., Tackaya T., van de Sande J. H.* Total Synthesis of the Structural Gene for the Precursor of a Tyrosine Suppressor Transfer RNA from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **251**, 565—694, 1976.
- Kim S. F., Suddath F. L., Quigley G. J., McPherson A., Sussman J. L., Wang A. H. J., Seeman N. C., Rich A.* Three Dimensional Tertiary Structure of Yeast Phenylalanine Transfer RNA, *Science*, **185**, 435—440, 1974.
- Kornberg A.* Active Center of DNA Polymerase, *Science*, **163**, 1410—1418, 1969.
- Kornberg T., Kornberg A.* Bacterial DNA Polymerases, pp. 119—144, in: P. D. Boyer, ed., *The Enzymes*, 3d ed., vol. X, 1974.
- Lehman I. R.* DNA Ligase: Structure, Mechanism and Function, *Science*, **186**, 790—797, 1974.
- Lodish H. F.* Translational Control of Protein Synthesis, *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 39—65, 1976.
- Losick R.* In vitro Transcription, *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 409—446, 1972.
- Maden B. E. H.* The Structure and Formation of Ribosomes in Animal Cells, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **22**, 127—177, 1971.
- Nathans D., Smith H. O.* Restriction Endonucleases in the Analysis and Restructuring of DNA Molecules, *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 273—293, 1975.
- Nirenberg M.* Protein Synthesis and the RNA Code, *Harvey Lect.*, **59**, 155—185, 1963—1964.
- Pestka S.* Inhibitors of Ribosome Functions, *Annu. Rev. Biochem.*, **40**, 697—710, 1971.
- Rich A., RajBhandary U. L.* Transfer RNA: Molecular Structure, Sequence and Properties, *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 805—860, 1976.
- Schekman R., Weiner A., Kornberg A.* Multienzyme Systems of DNA Replication, *Science*, **186**, 987—993, 1974.
- △ *Weissbach A.* Eukaryotic DNA Polymerases, *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 25—47, 1977.
- Weissbach H., Ochoa S.* Soluble Factors Required for Eukaryotic Protein Synthesis, *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 191—216, 1976.
- Yanojsky C.* Gene Structure and Protein Structure, *Harvey Lect.*, **61**, 145—168, 1965—1966.

См. также литературу к гл. 7 и 27.

Глава 27

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МЕТАБОЛИЗМА. III

Генетические вариации структуры белков.

Эволюция белков.

Наследственные нарушения метаболизма

Аминокислотная последовательность белков, ответственных за определенную биологическую функцию, практически одинакова для всех видов. Так, гемоглобин, цитохром *c*, инсулин, фибриноген, сывороточный альбумин и т. д. имеют характерные последовательности, которые уникальны для данного вида. Постоянство аминокислотной последовательности индивидуальных белков у каждого вида обусловлено высокой степенью точности репликации и транскрипции ДНК и трансляции нуклеотидной последовательности в аминокислотную последовательность белка (гл. 25 и 26). Различие аминокислотных последовательностей данного белка у различных видов отражает биологическую эволюцию, так как геном является результатом накопления мутаций, которые дали виду специфические преимущества в ходе эволюции. Таким образом, сравнение аминокислотных последовательностей белков с одинаковой или сходной функцией из различных видов дает возможность рассмотреть молекулярные события, происходившие в ходе эволюции.

Однако было бы преувеличением утверждать, что аминокислотная последовательность определенного белка всегда идентична у каждой особи данного вида; у некоторого процента особей (иногда малого, иногда большого) популяции определенный белок может иметь небольшое, но заметное отличие аминокислотной последовательности. Такой полиморфизм аминокислотной последовательности является отражением непрерывно происходящих мутаций генома данного вида и является настолько же важным для эволюции живого, как и кажущееся постоянство генома данного вида. Таким образом, сопоставление различий аминокислотных последовательностей структурных вариантов определенного белка в пределах одного вида отражает тип мутаций, которые постоянно возникают в ходе эволюции вида. Если структурные варианты обеспечивают специфические преимущества при размножении вида, то мутантный геном со временем может стать нормальным для данного вида. Большая часть мутаций структурных генов не дает

селекционных преимуществ для вида и не распространяется в популяции. Более того, некоторые мутации структурных генов приводят к нарушению функции белка и являются причиной наследственных болезней.

В этой главе мы остановимся на некоторых аспектах генетически обусловленных изменений структуры белка. Во-первых, будут рассмотрены имеющиеся данные о структурно-функциональных отношениях для некоторых белков, основанные на сравнении аминокислотных последовательностей определенного белка у ряда видов или вариантов его в пределах вида. В самом деле, природа провела для биохимиков элегантную серию экспериментов, дав широкий набор изменений последовательности белка, что позволяет углубиться в структурные основы биологического функционирования белка. Аналогичные эксперименты могут быть проведены и в лаборатории путем химической модификации белков, но они дают гораздо меньшую и менее определенную информацию по сравнению с тем, что получено при сопоставлении постоянства и изменчивости аминокислотной последовательности белка в ходе эволюции.

Во-вторых, мы рассмотрим те аспекты биохимической эволюции, которые могут быть основаны на сравнении аминокислотных последовательностей белков. На основе такого сопоставления и современных сведений о молекулярной генетике можно с определенной уверенностью предсказать тип изменения генома (ДНК), который привел в ходе эволюции к измененной структуре и модифицированной функции белка. Более того, сопоставление аминокислотных последовательностей позволяет понять некоторые основные концепции дарвиновской эволюции, включая естественный отбор, популяционные изменения и значение выживаемости генетически обусловленных вариантов белка. Наконец, будут рассмотрены генетически обусловленные различия структуры и функций различных белков с точки зрения аномалий метаболизма человека.

27.1. Замещение аминокислот и функции белка

Генетические различия структуры белков могут дать ценную информацию о роли отдельных аминокислотных остатков в функционировании специфических ферментов и других белков. Наиболее наглядным примером является сопоставление структуры и функций гемоглобина человека. В настоящее время известно более 300 вариантов человеческого гемоглобина. Многие из них обладают измененными функциональными свойствами. Как описано в гл. 31, корреляция структуры и функций нормального и аномальных гемоглобинов дала основу для широкого обсуждения структурных основ функционирования гемоглобина.

Интерпретация этих различий как результата аминокислотных замен основана на современных знаниях о структуре и функциях белков. Остатки на amino- и карбоксильном концах некоторых белков могут быть совершенно несущественны для их функций. Химические воздействия, которые изменяют определенные аминокислотные остатки, могут не влиять в заметной степени на функцию некоторых белков, например, превращение многих или всех лизиновых остатков в гомоаргининовые при действии O-метилизомочевины не меняют ферментативную активность цитохрома c, рибонуклеазы, лизоцима, папаина и т. д. Аналогичным образом другие аминокислотные остатки белка могут быть ацилированы, окислены или изменены другими способами без заметного влияния на функции. В отличие от этого есть аминокислотные остатки в ферментах, определяющие их функции, как это показано для определенных остатков, входящих в активные центры ферментов с помощью различного типа ингибиторов.

Можно ожидать, что именно эти остатки, находящиеся в активных участках и необходимые для связывания субстратов, кофакторов или простетических групп либо определяющие укладку и необходимую конформацию полипептидной цепи, не могут быть изменены генетически или путем химической модификации без глубокого влияния на функцию. Замещения остатков Gly I и Gly II, которые приводят к неактивным вариантам триптофансинтетазы (рис. 26.10), обусловлены, вероятно, влиянием на конформацию белка, так как остатки Gly могут быть замещены небольшими неполярными остатками, но не ионизируемыми группами. Исследование конформации молекулы миоглобина (разд. 31.2.3) или цепей гемоглобина (разд. 31.2.2) свидетельствует о том, что участки, на которых наблюдаются наибольшие изменения аминокислотной последовательности, не сопровождающиеся изменениями функции, находятся в тех участках полипептидной цепи, которые не вовлечены в непосредственные взаимодействия, необходимые для связывания O₂. Это подтверждается тем, что гемоглобины позвоночных обладают одинаковыми функциями; несмотря на существенные различия аминокислотных последовательностей и других свойств, все эти гемоглобины имеют сходную конформацию, которая необходима для связывания O₂.

Наиболее широкие исследования проведены к настоящему времени по аминокислотной последовательности цитохромов c для более чем 70 видов животных, растений, простейших и грибов. Последовательность цитохрома c человека приведена на рис. 12.11. У цитохромов, содержащих 103 или 104 аминокислотных остатка, до сих пор обнаружено примерно 20 константных остатков (рис. 27.1). Для всех других остатков обнаружены замены различных типов. Вообще говоря, многие типы консервативных замещений могут и не вызывать значительные изменения функциональных

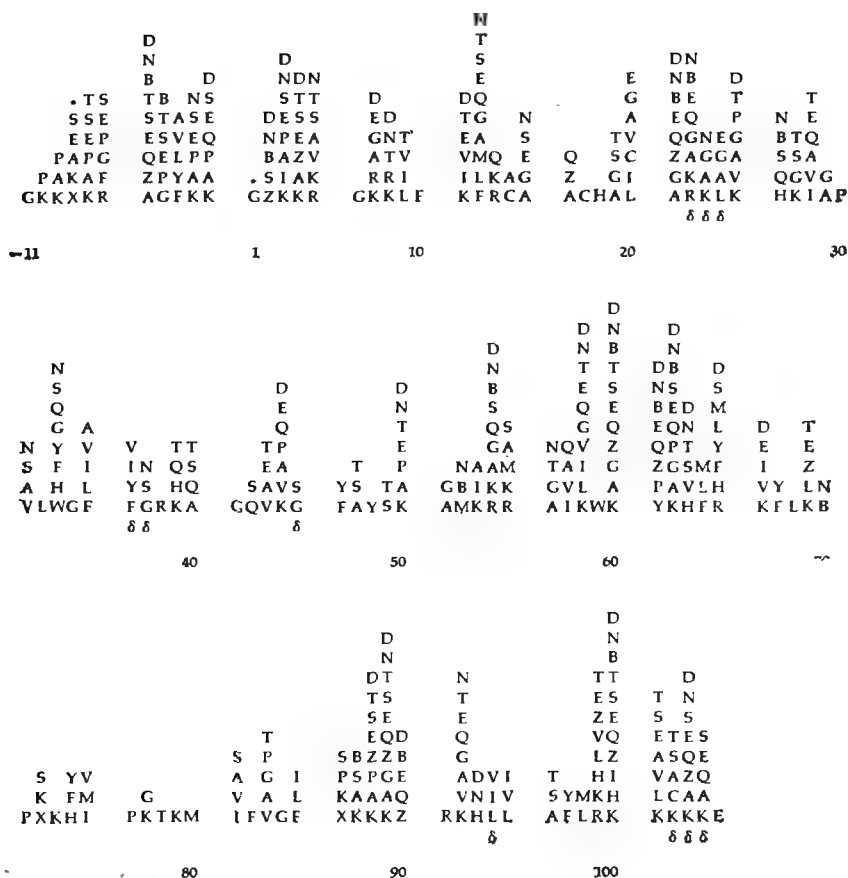


Рис. 27.1. Комбинированная аминокислотная последовательность всех известных в настоящее время цитохромов с животных, растений, грибов и простейших (более 70 различных видов). А — Ala, В — Asp или Asn, С — Cys, D — Asp, E — Glu, F — Phe, G — Gly, H — His, I — Ile, K — Lys, L — Leu, M — Met, N — Asn, P — Pro, Q — Gln, R — Arg, S — Ser, T — Thr, V — Val, W — Trp, X — триметиллизин, Y — Tyr, Z — Glu или Gln, δ — удалены для максимализации гомологии. Звездочкой отмечены: в положении —8 ацетилированные аминоконцевые группы всех высших растений, в положении 1. ацетилглицин у цитохромов с всех хордовых. У большинства видов гем связан с цистеинами в положениях 14 и 17. Лигандами гемного железа являются His-18 и Met-80. Единственный триметиллизиновый остаток в цитохромах грибов расположен в положении 72, а у высших растений два таких остатка — в положениях 72 и 86. Наиболее консервативная область — вблизи места связывания гема и вокруг лигандов гемного железа. У цитохромов простейших наибольшая вариация последовательности по сравнению с другими видами. (Margoliash E., Ferguson-Miller S., Kang C. H., Brautigan D. L., Fed. Proc., 35, 2125, 1976.)

свойств белка или фермента. В качестве примера мы можем привести замены алифатических гидрофобных остатков (Ile, Val, Leu, Met) и замещение одних полярных остатков другими (Arg на Lys, Glu на Asp, Gln на Asp). Даже ионизированные остатки с противоположными знаками могут заменять друг друга (Asp или Glu на Lys), вероятно, потому, что эти остатки расположены преимущественно на поверхности белка. «Радикальные» замещения, т. е. когда замещение происходит на остаток с другим типом боковой цепи, может происходить и без существенного изменения свойств в том случае, если локус не критичен для функции или конформации. Сопоставление трехмерных структур цитохромов с (рис. 4.1) тунца и лошади свидетельствует об отсутствии существенных различий конформации, что находится в согласии с ожидаемым на основании их функционального сходства (см. ниже).

В случае внеклеточного протеолитического фермента субтилизина, продуцируемого некоторыми бациллами, сравнение последовательностей ферментов из двух различных видов показывает 83 различия в последовательности длиной 274 остатка (у одного из этих белков также deletирован один аминокислотный остаток). Согласно трехмерной структуре, только два из этих различий расположены во внутренней части белковой глобулы, а остальные расположены на поверхности. Некоторые замещения на поверхности глобулы относятся к консервативному типу, другие — к «радикальному», но вблизи от активного центра фермента и участка связывания нет значительных замещений. Это отражает тот факт, что оба субтилизина полностью активны и имеют почти идентичные кинетические характеристики и специфичность.

27.2. Эволюция и структура белка

Сравнение белков из различных организмов показывает, что в ходе эволюции 1) белки, выполняющие одинаковые функции на всех филогенетических уровнях, например цитохромы с, синтез которых кодируется *гомологичными* генами, сильно модифицированы; 2) некоторые белки исчезли; 3) появилось много новых белков. Так как структура и распределение белков в прямом смысле составляют фенотипический характер вида, эти три основных типа изменений отражают действие эволюции.

Только для сравнительно небольшого количества белков известны последовательности на различных филогенетических уровнях. Однако, очевидно, что функционально те же самые ферменты из филогенетически удаленных видов сохраняют общие элементы структуры, но могут иметь существенно различающиеся последовательности. Например, пентапептиды, полученные при триптическом гидролизе и содержащие фосфорилированный остаток серина,

одинаковы для фосфоглюкомутазы (разд. 15.3.3) из *E. coli*, дрожжей и мышц кролика. Однако ферменты из этих различных источников, хотя и имеют примерно одинаковую молекулярную массу, существенно различаются по аминокислотному составу. Важная для ферментативной активности сульфгидрильная группа глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы содержится в одинаковом октапептиде после протеолиза ферментов из дрожжей и мышц кролика, которые отличаются в других отношениях. Многочисленные аминокислотные замены, которые возникли в этих белках в результате мутаций гомологичных участков ДНК, не повлияли на их ферментативную функцию.

Более существенно, однако, то, что у всех функциональных белков не возникает изменений аминокислотной последовательности в области активного участка. Вероятно, любое изменение на этом участке либо изменяет его стерическое соответствие и способность связывать субстрат, либо приводит к утрате той группы, которая принимает участие в каталитическом процессе (серина, гистидина, сульфгидрильной группы и т. д.), что должно уничтожать ферментативную активность белка. Потеря активности может также быть обусловлена такими изменениями структуры, которые изменяют конформацию белка и вследствие этого структуру активного центра. Очевидно, что мутации такого типа, так же как терминаторные мутации, являются причиной возникновения у животных необходимости получения некоторых аминокислот, жирных кислот, витаминов и т. д. с пищей. Таковыми являются некоторые мутации триптофансинтетазы (разд. 26.5.5). Хотя в этом случае еще нельзя определить активный участок, мутанты, полученные облучением, синтезируют ферментативно инертные белки, которые идентичны нормальному ферменту, за исключением единичных аминокислотных замен.

Неизвестно, продолжают ли позвоночные синтез аналогичных нефункциональных производных ранее активных белков, которые когда-то осуществляли синтез соединений, являющихся в настоящее время необходимыми компонентами пищи человека, например триптофана и тиамина. Не все замещения в определенных участках губительны для функционирования. На самом деле, известна значительная толерантность по отношению к заменам, делециям и вставкам аминокислот во многих участках различных белков (рис. 27.1). В дополнение к информации, полученной при изучении аминокислотной последовательности белков, подтверждение такой толерантности дают: 1) специфические иммунохимические свойства аналогичных белков из различных видов; 2) тот факт, что многие ферменты нечувствительны к химической модификации различных аминокислотных остатков; 3) возможность протеолитического удаления фрагментов полипептидной цепи без инактивации; 4) существенное различие аминокислотного состава многих гомо-

логичных ферментов и других белков различных видов организмов.

Как уже упоминалось выше, белком, о котором имеется наибольшая информация, является цитохром *c*. Для того чтобы цитохром *c* мог работать, мутации не должны изменять его соответствие как по отношению к цитохромоксидазе, так и по отношению к цитохрому *c*₁, изменять его потенциал или характер его взаимодействия с гемом. Так как животные, растения и грибы дивергировали от одной исходной формы, аминокислотные замещения накапливались в цитохромах *c* этих видов без существенного влияния на их функции по митохондриальному электронному транспорту.

Количества аминокислотных замен у цитохромов *c* различных видов для 104 гомологичных остатков сопоставлены в табл. 27.1. Из таблицы видно, что, во-первых, у близко родственных позвоночных цитохромы либо вообще не различаются, либо различаются по немногим остаткам, например у человека и других приматов, у различных копытных. Во-вторых, чем больше предполагаемое таксо-

Таблица 27.1
Вариации структуры цитохромов *c*

Вид	Количество аминокислотных замен по сравнению с цитохромом человека ^а	Сопоставляемые цитохромы	Количество различающихся аминокислотных остатков
Шимпанзе	0	Лошадь и собака	6
Обезьяна резус	1	Лошадь и свинья	3
Кенгуру	10	Свинья, корова и овца	0
Собака	11	Свинья и кит	2
Лошадь	12	Кит, верблюд и гуанако	0
Цыпленок	13	Лошадь и кенгуру	7
Гремучая змея	14	Кролик и свинья	4
Тунец	21	Кролик и собака	5
Налим	23	Налим и тунец	14
Мотылек (<i>Samia cynthia</i>)	31	Мотылек и тунец	33
Пшеница	35	Мотылек и дрожжи	48
<i>Neurospora</i>	43	<i>Neurospora</i> и пшеница	46
Дрожжи	44	Дрожжи и <i>Neurospora</i>	39

^а Большая часть цитохромов позвоночных имеет 104 остатка. Сопоставляются именно эти остатки без учета дополнительных остатков на NH₂-конце цитохромов беспозвоночных. В таблице приведены результаты нескольких исследований.

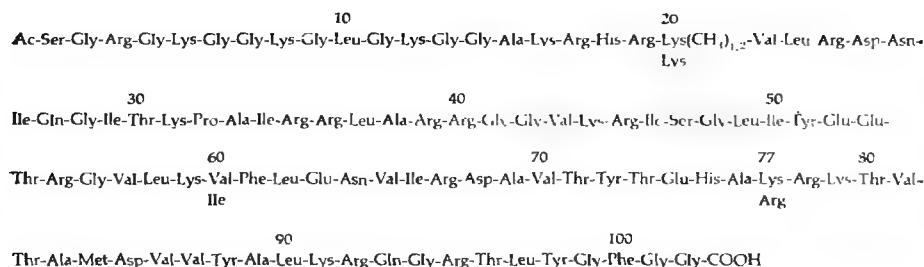


Рис. 27.2. Аминокислотная последовательность гистона Н4 тимуса теленка. Остатки, отличающиеся от таковых в гомологичном Н4 проростков гороха — консервативные замены в положениях 60 (Ile) и 77 (Arg). Остаток 20 в гистоне теленка представлен смесью моно- и диметиллизина, модифицированными при посттрансляционном метилировании. Lys-20 в гистоне гороха не метилирован. (DeLange R. J., Fambrough D. M., Smith E. L., Bonner J., J. Biol. Chem., 244, 2678, 1969.)

номическое различие, тем больше отличаются цитохромы. Это четко проявляется у позвоночных и при сравнении позвоночных с растениями (пшеница), насекомыми и аскомицетами (дрожжи, *Neurospora*). Однако цитохромы дрожжей и *Neurospora* отличаются друг от друга так же сильно, как эти цитохромы от цитохромов высших организмов. Это указывает на то, что эти организмы либо очень давно дивергировали, либо большая скорость репродукции этих микроорганизмов приводит к накоплению различий в последовательности за более короткое время.

Все упомянутые в табл. 27.1 цитохромы *c* реагируют с цитохромоксидазами дрожжей и млекопитающих. Это свидетельствует о том, что принципиальные черты структуры и функций цитохрома *c* не претерпели существенных изменений за время эволюционной дивергенции животных, растений и грибов, которая произошла более двух миллиардов лет назад. Так как функция цитохрома *c* сводится к митохондриальному окислению и фосфорилированию, митохондрии должны были возникнуть не позднее этого срока. В настоящее время возраст Земли оценивается примерно в 4,5 миллиарда лет. В связи с этим одна из критических стадий эволюции — возникновение эффективного аэробного метаболизма, почти наверняка возникла на ранних этапах эволюции. Путем изучения других «древних» белков возможно дальнейшее проникновение в эволюцию и возникновение основных клеточных процессов.

Хотя цитохромы *c* и другие белки претерпели многочисленные изменения в ходе эволюции, это не является общим правилом для всех белков. Гистон Н4 (разд. 25.3.5) тимуса теленка отличается от гомологичного белка проростков гороха двумя консервативными аминокислотными заменами в последовательности длиной 102 остатка (рис. 27.2). Так как эволюционные пути растений и животных разошлись почти два миллиарда лет назад, то очевидно, что

селекционное давление стремилось к сохранению последовательности этих белков. Это свидетельствует не только о том, что практически каждый остаток в последовательности гистона H4 критичен для его функции и что почти все мутации были отмечены отбором, но и о том, что специфическая функция этого белка возникла очень рано и специфична при эволюции эукариотических организмов.

Приведенные выше рассуждения дают основание для заключения о том, что не все белки эволюционировали или эволюционируют с одинаковой скоростью. «Древние» белки, такие, как гистон H4, должны были претерпеть эволюцию, приведшую к определенной последовательности, на раннем этапе и с тех пор очень мало изменились. В отличие от этого белки, появившиеся позже в ходе эволюции, в частности белки высших организмов, показывают гораздо большие изменения структуры в ответ на изменения давления отбора и экстремальные условия. Обсуждаемый ниже гемоглобин — прекрасный пример такого явления.

27.2.1. Изменения генома

Важно понимать, что многие типы изменений ДНК могут приводить к изменениям структуры белков. Хотя многие из этих изменений были получены экспериментально при действии рентгеновых или ультрафиолетовых лучей или химических мутагенов, изучение структуры белков показывает, что аналогичные изменения ДНК возникают и спонтанно в ходе эволюции. Природа мутагенов, действующих во время эволюции, открыта для предположений, но генетические изменения, обсуждаемые ниже, — это те, которые могут привести к изменениям белков и, следовательно, к изменениям их функций.

27.2.1.1. Точечные мутации

Точечные мутации проявляются в виде замещений отдельных аминокислот в результате изменения отдельных пар оснований. Они являются наиболее обычными изменениями и были идентифицированы у многих белков из многих видов. Белком, для которого в настоящее время известно наибольшее количество точечных мутаций, является человеческий гемоглобин (гл. 31).

27.2.1.2. Делеции и вставки

Известно много примеров делеций и вставок одного или нескольких аминокислотных остатков как внутри, так и на концах пептидных цепей. Это было обнаружено как при изучении белка одного вида (например, гемоглобина человека, гл. 31), так и при исследовании многих гомологических белков из различных видов.

Например, все цитохромы с позвоночных имеют 103 или 104 остатка, а цитохромы с растений и беспозвоночных имеют множество дополнительных остатков на N-конце и делеции отдельных остатков внутри цепи (рис. 27.1). Чтобы образовался функциональный белок, делеции или вставки внутри полипептидной цепи должны быть обусловлены утратой или вставкой одного или нескольких нуклеотидных триплетов (разд. 26.4). Делеции или добавления на концах полипептидной цепи должны отражать мутации, приводящие к образованию нового инициаторного кодона в различных локусах (разд. 26.3.1) или кодонов терминации (разд. 26.3.3) в соответствующих участках ДНК.

27.2.1.3. Дупликация генов

Высшие организмы синтезируют гораздо больше белков, чем простейшие. Это согласуется с увеличением общего количества ДНК в геноме. Первичным процессом, с помощью которого происходит это увеличение, является полная дупликация единичного гена, полной хромосомы или полного набора хромосом (полиплоидия, см. ниже). После такой дупликации, если потомство жизнеспособно, диплоидные клетки имеют уже не два, а четыре гена для каждого белка; в последующих генерациях каждая пара генов может изменяться независимо. В то время как одна пара генов продолжает направлять синтез исходного функционального белка, другая пара может претерпевать относительно большие мутационные изменения и, наконец, становится ответственной за синтез белка с той же функцией, но отличающегося по специфичности, по активности либо даже выполняющего другую функцию. Если измененный белок дает большие преимущества для выживания, то он сохраняется, организм процветает и может занять несколько иную экологическую нишу. Хотя и нет точных свидетельств, было предположено, что дупликация генов сама по себе повышает жизнеспособность (и, следовательно, селекционные преимущества), приводя к увеличению скорости образования мРНК и соответственно синтеза белка, в частности, в том случае, когда должен синтезироваться белок, состоящий из нескольких идентичных субъединиц.

Следует отметить, что изменение специфичности или функции белка связано обычно с «радикальным» замещением аминокислотного остатка; только таким образом можно обычно достичь существенного изменения свойств исходного белка. Большая часть «радикальных» замещений дает дефектный белок, что приводит к генетическим нарушениям (см. ниже) и к меньшей жизнеспособности. Иными словами, генетические изменения, которые увеличивают выживаемость в одном случае, могут вести к уменьшению вы-

живаемости в другом случае. Консервативные замещения аминокислотных остатков редко приводят к изменениям функций.

Доказательства полной дубликации генов поразительны и обнаружены во многих случаях. Один из типов представлен полисубъединичными ферментами, у которых два вида субъединиц — не идентичных, а гомологичных, как у рассмотренных ниже гемоглобинов позвоночных. Второй тип дубликации генов проявляется у гомологичных белков, содержащих одну полипептидную цепь, например у протеаз серин-гистидин-аспарагинового типа с существенно различной специфичностью (разд. 9.3.1) (см. ниже), а также у некоторых гомологичных полипептидных гормонов с резко различающейся специфичностью. Другим примером являются изоферменты гомологичной структуры с различными активностью и внутриклеточной локализацией.

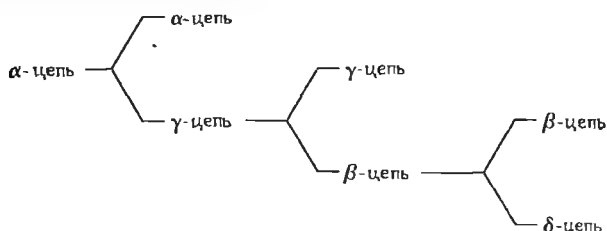
Когда были установлены аминокислотные последовательности α - и β -цепей гемоглобина HbA, γ -цепи гемоглобина HbF и δ -цепи гемоглобина HbA₂, было определено количество различий между этими гомологическими цепями (табл. 27.2).

Таблица 27.2
Аминокислотные вариации в цепях
гемоглобина человека

Сопоставляемые цепи	Количество отличающихся аминокислотных остатков
β и δ	6
β и γ	36
α и β	78
α и γ	83

Цепи β , γ и δ имеют меньше отличающихся аминокислотных остатков, чем при сопоставлении каждой из этих цепей с α -цепью. Сопоставление α - и β -цепей гемоглобина человека HbA с гемоглобином некоторых других млекопитающих, таких, как лошадь, показывает меньшее различие, чем между α -цепями. Более того, так как α -цепь одинакова у гемоглобинов HbA, HbF и HbA₂, было предположено, что α -цепь является самой «древней» и может быть гомологична мономерному, как и миоглобин, гемоглобину миноги, хотя его неоксигенированная форма димерна. Это резко отличается от гемоглобинов других позвоночных, которые тетрамерны, например HbA- $\alpha_2\beta_2$, HbF- $\alpha_2\gamma_2$, HbA₂- $\alpha_2\delta_2$. На основе обнаруженного количества различий было далее предположено, что последовательная дуп-

ликация генов α -, γ - и β -цепей привела в ходе эволюции к четырем цепям следующим образом:



Таким образом, полная дупликация гена α -цепи привела к двум генам, которые эволюционировали независимо и дали в конце концов α - и γ -гены. Аналогичным образом γ -ген позднее дублировался, дав β -ген, а β -ген дал δ -ген.

Подтверждающие это данные были получены при изучении гемоглобинов одного порядка — приматов. Живущие ныне представители приматов, согласно палеонтологическим данным и их сравнительной анатомии, появились в следующем порядке: древесные обезьяны (тупай), лемуры, лори, обезьяны Нового Света, обезьяны Старого Света, человекообразные обезьяны, человек. В α -цепях представителей этих родов сравнительно мало различий типа аминокислотных замен. Но различие β -цепей возрастает при переходе от человека к более примитивным формам; наиболее важным является то, что замещения возникают преимущественно в тех положениях, по которым β -цепь человека отличается от γ -цепи. На самом деле, гемоглобин взрослых тупай и лемуров похож на фетальный гемоглобин человека (HbF) больше, чем на человеческий HbA, включая устойчивость к щелочной денатурации.

Вариации первичной структуры гемоглобина позвоночных весьма широко, что должно отражать главным образом огромный размах приспособления этих видов к аэробной жизни — от глубин морей до больших высот, от неподвижных до высокоподвижных видов в воде, на земле и в воздухе, от свободноживущих пресноводных и морских пелагических эмбрионов до защищенных эмбрионов живородящих видов и до покрытых оболочкой эмбрионов многих рептилий и всех птиц. Эта эволюционная адаптация отражалась в сродстве гемоглобинов к кислороду, в соответствии с содержанием CO_2 в крови, а также в других характеристиках (гл. 31).

Другим примером дупликации генов, приводящей к другим функциям, являются мономерные структуры трипсина, химотрипсина А, химотрипсина В и эластазы. Аминокислотная последовательность этих ферментов (разд. 9.3) обладает значительной гомологией, например у трипсина и химотрипсина А идентичны примерно 40% последовательности. Это пример, показывающий, что при со-

хранении аналогичной функции — гидролиза белков, изменения коснулись специфичности по типу гидролизуемой связи (табл. 6.3 и разд. 9.3). На участке связывания остатка, примыкающего к расщепляемой связи, у трипсина расположен остаток аспарагиновой кислоты, а у химотрипсина — остаток серина. Это изменение отражает их различие в специфичности связывания. Очевидно, что для позвоночных, зависящих от поступления аминокислот с пищей, повышению жизнеспособности может способствовать появление множества протеиназ, способных максимально расщеплять белки пищи. Далее, тромбин и другие протеолитические ферменты, участвующие в свертывании крови (гл. 29), также гомологичны панкреатическим протеиназам, что отражает дубликацию генов. Это дает возможность использовать ферменты общего типа для различных функций. Аналогичным образом напоминает по свойствам трипсин и коконаза некоторых насекомых, но функция последней заключается в переваривании фибрина кокона, что позволяет созревшей особи выйти из кокона. В табл. 27.3 показаны частичные последо-

Таблица 27.3

Гомология последовательностей вокруг активных остатков серина и гистидина у панкреатических протеиназ и некоторых родственных ферментов

Фермент	Активный серин ^а	Активный гистидин
Бычий трипсин	Cys-Gln-Gly-Asp- Ser -Gly-Gly-Pro-Val	Ser-Ala-Ala- His -Cys-Tyr
Бычий химо-трипсин А	Cys-Met-Gly-Asp- Ser -Gly-Gly-Pro-Leu	Thr-Ala-Ala- His -Cys-Gly
Бычий химо-трипсин В	Cys-Met-Gly-Asp- Ser -Gly-Gly-Pro-Leu	Thr-Ala-Ala- His -Cys-Cly
Свиная эластаза	Cys-Gln-Gly-Asp- Ser -Gly-Gly-Pro-Leu	Thr-Ala-Ala- His -Cys-Val
Бычий тромбин	Cys-Glu-Gly-Asp- Ser -Gly-Gly-Pro-Phe	Thr-Ala-Ala- His -Cys-Leu
Протеиназа <i>Sorangium</i>	Gly-Arg-Gly-Asp- Ser -Gly-Gly-Ser-Trp	Thr-Ala-Gly- His -Cys-Gly
Протеиназа <i>Streptomyces griseus</i>	Cys-Gln-Gly-Asp- Ser -Gly-Gly-Pro-Val	Thr-Ala-Ala- His -Cys-Val

^а Активные остатки на активных участках выделены жирным шрифтом. Приведенные два набора последовательностей удалены друг от друга на первичной структуре.

вательности некоторых из этих ферментов вблизи от остатков гистидина и серина, входящих в активные участки этих ферментов.

По-видимому, одним из наиболее поразительных примеров полной дубликации гена являются иммуноглобулины, которых у каж-

дого существа многие тысячи, каждый из них обладает определенной специфичностью, но все они структурно гомологичны* (гл. 30).

Полипептидные гормоны нейрогипофиза (гл. 48) являются другим примером эволюции структуры и свойств. Структура этих гормонов приведена в табл. 27.4. Эволюция полипептидных гормонов является ярким примером замены единичных оснований в кодо-

Таблица 27.4

Аминокислотная последовательность некоторых нейрогипофизных гормонов

Гормон	Положение остатков ^a	Вид
	1 2 3 4 5 6 7 8 9	
Глумитоцин	Cys-Tyr-Ile-Ser-Asp-Cys-Pro-Gln-GlyNH ₂	Хрящевые рыбы
Изотоцин	Cys-Tyr-Ile-Ser-Asp-Cys-Pro-Ile-GlyNH ₂	Костистые рыбы
Мезотоцин	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asp-Cys-Pro-Ile-GlyNH ₂	Амфибии
Вазотоцин	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asp-Cys-Pro-Arg-GlyNH ₂	Костистые рыбы, амфибии
Окситоцин	Cys-Tyr-Ile-Gln-Asp-Cys-Pro-Leu-GlyNH ₂	Млекопитающие
Вазопрессин	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asp-Cys-Pro-Arg-GlyNH ₂	Млекопитающие, кроме свиньи
Вазопрессин	Cys-Tyr-Phe-Gln-Asp-Cys-Pro-Lys-GlyNH ₂	Свинья

^a Дисульфидные мостики связывают 1- и 6-остатки во всех случаях. Различающиеся аминокислотные остатки этих гормонов отмечены жирным шрифтом.

нах. Эти замены происходят последовательно, приводя к замещению одной аминокислоты. Вазотоцин лягушки обладает слабой вазопрессорной и окситоциновой активностью в отличие от мощных гормонов млекопитающих и других высших позвоночных. Переход от вазотоцина к аргинин-вазопрессину заключается в замещении Ile в положении 3 на Phe, а переход от вазотоцина к окситоцину — в замене Arg в положении 8 на Leu. Для эволюции от одного к двум и более гормонов у того же самого вида мы должны предположить дубликацию генетического материала и последующие точечные мутации для независимого образования двух и более гормонов. Аналогичные отношения обнаружены для АСТН, МSH и β -липотропида (гл. 48) и для двухцепочечных гормонов — фолликулостимулирующего, тиростимулирующего и лютеинизирующего гормонов и хорионического гонадотропина; все они содержат идентичную α -цепь и различные β -цепи (гл. 48).

* Как сейчас выясняется, здесь работает механизм гораздо более сложный, чем простая дубликация генов. — *Прим. перев.*

Структуры гормонов секретина и глюкагона достаточно близки, что свидетельствует об их общем генетическом происхождении (гл. 34). Это один из поразительных примеров изменения как функции, так и контроля синтеза этих белков. Глюкагон, синтезирующийся в поджелудочной железе, повышает концентрацию глюкозы в крови, увеличивая гликогенолиз в печени (разд. 15.5.2.1). Секретин, образующийся в слизистой кишечника, стимулирует выделение поджелудочного сока (гл. 34). Вероятно, дупликация гена привела к эволюции двух различных гормонов с независимым генетическим контролем и каждый из них продуцируется специфическими клетками.

Другим примером близких структурных отношений являются яичный лизоцим и один из двух компонентов *лактозосинтазы* (разд. 8.7.2.3) — α -*лактальбумин* коровьего молока. Из 129 остатков лизоцима и 123 остатков лактальбумина по меньшей мере 40 идентичны в соответствующих положениях, а 27 представлены консервативными замещениями. Кроме того, четыре дисульфидных мостика расположены в таких же положениях у обоих белков. На основании такой гомологии можно заключить, что оба белка возникли путем дупликации гена-предшественника, причем один из них продолжает кодировать лизоцим, а другой в результате мутаций дает α -лактальбумин. Это очевидный пример появления новой функции, причем один фермент катализирует гидролиз $\beta(1\rightarrow4)$ -гликозидной связи, а другой участвует в синтезе такой связи (разд. 8.7.2.3). Кроме того, α -лактальбумин является компонентом фермента, возникшего позже при эволюции, так как лактоза появилась только в молоке млекопитающих.

Кроме дупликации целых генов имеется множество доказательств дупликации и *слияния генов*. Это такое мутационное событие, когда при дупликации гены сливаются друг с другом. После дупликации такого типа ген определяет белок, в котором последовательность от NH_2 - до COOH -конца повторена по крайней мере частично. Таким образом ген, образовавшийся путем дупликации и слияния, определяет последовательность белка, в котором первая половина почти идентична второй. Наиболее поразительным примером дупликации и слияния являются α^1 - и α^2 -цепи гемоглобина человека (рис. 29.4). Этот тип мутации допускает удлинение полипептидной цепи; когда это происходит во время эволюции, дальнейшее изменение гена в результате накопления точечных мутаций, делеций и вставок приводит к возникновению новых функций, что можно видеть на примере иммуноглобулинов; произошли они, вероятно, от общего предшественника — гена, который кодировал полипептид из примерно 110 остатков* (гл. 30). После дупликации

* В настоящее время происхождение иммуноглобулинов представляется гораздо более сложным с участием так называемого «сплайсинга». — *Прим. перев.*

и слияния и дальнейших мутаций слившихся генов различные части иммуноглобулиновых цепей приобрели различные биологические функции.

27.2.1.4. Ассоциация и слияние генов

Лактозосинтаза является примером другого явления — ассоциации двух белковых компонентов различной структуры с образованием фермента с новой специфичностью. Многочисленные примеры мультикомпонентных ферментов были перечислены в третьей части. Некоторые из них, например лактат- и глутаматдегидрогеназы (разд. 14.4.2), состоят из идентичных субъединиц, в то время как другие — из совершенно различных субъединиц, например аспарататранскарбамоилаза *E. coli*, которая состоит из каталитической и регуляторной субъединиц (разд. 13.3), бактериальная РНК-полимераза, цитохромоксидаза (разд. 13.3) и митохондриальная АТР-синтетаза (разд. 12.5.5.1). Каждый из них содержит различные субъединицы, общее количество которых варьирует от четырех до шести. Как возникают такие ассоциаты, до сих пор неясно.

Для некоторых ферментных субъединиц известно, что когда ассоциируют две субъединицы, катализирующие две последовательные стадии, суммарная эффективность процесса повышается. Это показано для α - и β -субъединиц триптофансинтетазы *E. coli* (разд. 20.4.1.11). У *Neurospora* функции обеих субъединиц фермента *E. coli* выполняются двумя участками единой большой полипептидной цепи. Таким образом, в последнем случае должно было произойти слияние двух генов, обеспечивающее прохождение последовательных стадий на единой белковой поверхности и равную активность при катализе обеих стадий. Аналогичным образом слияние генов должно было произойти и в случае пальмитатсинтетазы (гл. 17) эукариот в отличие от отдельных ферментов у *E. coli* и других прокариот. Слияние генов вероятно также и для первых трех ферментов синтеза пиримидиновых нуклеотидов у млекопитающих (гл. 24).

27.2.1.5. Транслокация

В классических генетических исследованиях на дрозофиле и других организмах было показано, что часть одной хромосомы может быть перенесена (транслоцирована) в другую хромосому. Очевидно, что аналогичные транслокации происходили и в ходе эволюции при дупликации генов субъединиц гемоглобина человека (гл. 31). Два α -гена расположены на одной хромосоме, в то время как гены β - и γ -цепей тандемно расположены на другой хромосоме.

Некоторые транслокации могут быть предпочтительными для образования ассоциатов ранее независимых генов; обратное так-

же может быть справедливо. Там, где произошло слияние генов (см. выше), гены белков, выполняющих близкие (по метаболическому пути) функции, соседствуют друг с другом на хромосоме. Неизвестно, играет ли в этом какую-нибудь роль транслокация генов. С другой стороны, когда после дупликации генов каждый из них эволюционирует независимо и приводит к новой функции, исходная тесная ассоциация генов может оказаться нежелательной. Транслокация дает возможность разделения генетического и регуляторного контроля.

27.2.1.6. Полиплоидия

Дупликация хромосом особенно легко происходит у растений. Так, возможно искусственно индуцировать слияние ядер двух различных видов и дупликацию хромосом двух родительских типов с образованием гибридного вида. Удвоение необходимо для того, чтобы произошла конъюгация хромосом перед редукционным делением или мейозом (образованием гаплоидных гамет), чтобы каждая из дочерних клеток имела полный набор хромосом. Первым примером такого рода было скрещивание капусты и редьки. В настоящее время агрономическое значение в определенных климатических условиях приобрели некоторые линии гибрида пшеницы (*Triticum*) и ржи (*Secale*). Новый вид (*Triticale*) засухо- и морозоустойчив, стабильно созревает в тех районах, где пшеница не всегда вызревает, а мука имеет преимущества перед ржаной.

Хотя такая форма эволюции, вероятно, имела некоторые преимущества для растений, до сих пор нет данных, что она имела значение для эволюции животных.

27.2.1.7. Симбиоз

Известно много примеров тесной ассоциации двух различных видов с очевидной выгодой для метаболизма обоих, например клубеньковых бактерий и бобовых растений. Было предположено, что некоторые органеллы эукариотических клеток возникли в результате симбиотического включения свободноживущих одноклеточных организмов — сине-зеленые водоросли были предшественниками хлоропластов высших растений, а аэробные бактерии — предшественниками митохондрий. Оба типа органелл содержат ДНК, кодирующую соединения, отличные от тех, которые кодирует ядерная ДНК; каждая органелла содержит характерные белки, родственные таковым у предполагаемых исходных прародителей.

Хлоропласты эукариотических красных водорослей содержат фикобилипротеины (разд. 16.3.2.2), которые гомологичны по первичной структуре и иммунологически родственны таковым из прокариотических сине-зеленых водорослей. Сохранилась даже кон-

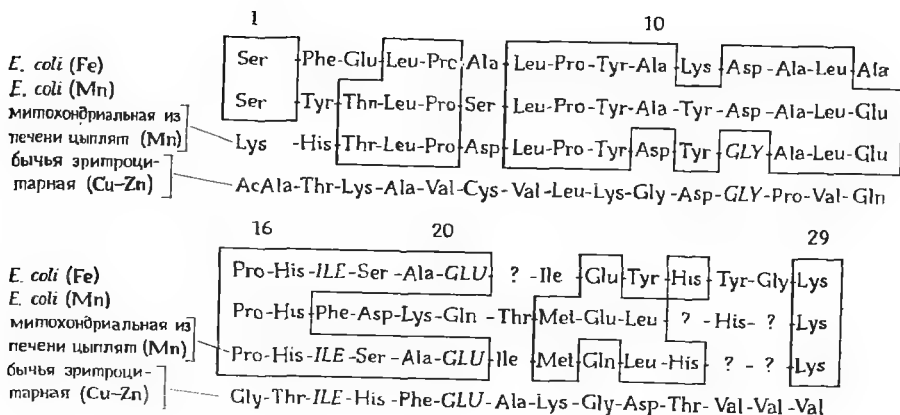


Рис. 27.3. Сопоставление N-концевых последовательностей супероксиддисмутазы нескольких источников. Сплошной линией обведены остатки, идентичные в двух ферментах *E. coli* и одном митохондриальном ферменте. Курсивными заглавными буквами показаны идентичные остатки у одного или более из этих ферментов и супероксиддисмутазы из эритроцитов быка. У первых трех ферментов значительная гомология наблюдается не только в этой части последовательности, но также и на других участках этих трех полипептидных цепей, а у фермента из эритроцитов (цитоплазматического) наблюдается лишь небольшое сходство, говорящее в пользу иного происхождения последнего. Ac — ацетил; ? — неизвестный аминокислотный остаток. (Steinmon H. M., Hill R. L., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 70, 3726, 1973.)

формация этих белков, так как α -субъединицы фикоцианина одного вида могут соединяться с β -субъединицами другого вида, образуя гибридную молекулу, неотличимую от молекул исходного типа.

Клетки млекопитающих содержат как цитоплазматическую, так и митохондриальную супероксиддисмутазу, которая абсолютно необходима для аэробной жизни и отсутствует только у облигатно анаэробных организмов (разд. 13.7.6). Митохондриальный фермент гомологичен по последовательности и содержанию металла ферментам аэробных бактерий (рис. 27.3), в то время как фермент из цитоплазмы эритроцитов отличается от них по этим признакам. Аналогичным образом аэробные бактерии содержат такой тип цитохрома, который гомологичен по последовательности и конформации эукариотическому митохондриальному цитохрому *c*. Концепция о возникновении этих органелл из других организмов подтверждается тем, что митохондрии и хлоропласты способны к самостоятельному делению и размножению.

То, что хлоропласты и митохондрии возникли в результате симбиотического включения других организмов с последующей потерей ряда функций в «новом» виде, кажется весьма привлекательной точкой зрения потому, что организмы с более разнообразным

генетическим репертуаром должны иметь большую возможность выжить при изменении окружающей среды. ДНК дрожжевых митохондрий кодирует примерно дюжину полипептидных цепей, для каждой из которых характерна необыкновенно высокая концентрация гидрофобных остатков. Каждый из этих полипептидов является компонентом фермента или переносчиком электронов и входит в состав внутренней мембраны митохондрий; так, только три полипептида цитохромоксидазы синтезируются в митохондриях, а остальные кодируются ядерной ДНК и синтезируются цитоплазматическими рибосомами. Ограниченный геном митохондрий является, вероятно, остатком генома древнего бактериального предшественника.

Способность многих бактериофагов к трансформации (разд. 25.2.1), т. е. к переносу фрагментов ДНК из одного организма в другой, а также включение вирусного генома в хозяйский (гл. 28) наводит на мысль о дополнительных путях обмена и увеличения генома существующих видов.

27.2.1.8. Утрата генома

В разд. 27.2 уже говорилось о том, что белки (ферменты), выполнявшие одинаковые функции, утрачивались в ходе эволюции. Было показано, что штаммы *E. coli*, утратившие способность синтезировать аминокислоты, например триптофан, могут в триптофан-содержащей среде расти быстрее, чем бактерии дикого типа, сохранившие способность синтезировать триптофан. Так как для образования ДНК, мРНК и белков требуется значительная энергия в виде АТФ, то утрата гена, если необходимый метаболит легко доступен из окружающей среды, дает селекционные преимущества. Поэтому было предположено, что высшие организмы, утратившие способность синтезировать некоторые аминокислоты, витамины и т. д., приобрели несколько повышенную жизнеспособность.

27.2.1.9. Изменение регуляции

Все отмеченные выше изменения могут вызвать изменения аминокислотной последовательности белков и в результате дупликации генов увеличение генома. Однако нельзя забывать, что изменение структуры и набора регуляторных генов также может оказывать существенное влияние. Регуляторные гены влияют на относительное и абсолютное количество различных белков и ферментов и, естественно, на все метаболические пути. Так как у высших организмов количество клеток различного типа и размеры органов и организма в целом находятся под генетическим контролем, регуляторные гены оказывают большое влияние на фенотипический характер организма. Достаточно упомянуть огромное различие размеров

млекопитающих — мышь и кит, а также большое различие отношения массы мозга к массе тела, что отличает различные виды. Однако существует относительно немного различий типов клеток у разных млекопитающих, причем эти различия преимущественно количественные. К сожалению, до сих пор очень мало данных относительно генов, регулирующих дифференцировку и уникальные особенности различных видов млекопитающих.

27.3. Выражение эволюционных факторов

Дарвиновская эволюция проявляется через жизнеспособность, т. е. способность потомства определенного индивидуума конкурировать за определенную экологическую нишу. Эволюция может быть описана также как «передача признаков с модификацией». Несомненно, что большая часть мутаций вредносна, они уменьшают жизнеспособность, и мутантные особи или их потомство должны в конце концов исчезнуть. Некоторые модификации могут быть нейтральны. Они распространяются в популяции скорее всего тогда, когда ассоциированы с изменениями, увеличивающими жизнеспособность.

Передачу признаков с модификацией можно легко оценить по *дивергенции* аминокислотной последовательности гомологичных белков, например цитохромов *c* (разд. 27.2). На основе данных, приведенных в табл. 27.1, или, лучше, на основе вычисленного количества мутаций в кодонах, приводящих к аминокислотным заменам, можно построить филогенетическое дерево эволюции белков; это дерево согласуется с построенным ранее на основе общих морфологических и других биологических данных.

Как уже было отмечено (разд. 27.2), скорость дивергенции различна для различных белков, гомологичность которых известна. Даже для эволюции одного белка — цитохрома *c*, в настоящее время ясно, что темп мутаций, проявляющихся в аминокислотной последовательности, меняется во времени и различен для разных семейств. Слишком мало данных имеется для того, чтобы утверждать, что это верно и для других белков или что скорость накопления точечных мутаций у ряда белков относительно постоянна во времени. В любом случае из вышеперечисленных данных очевидно, что эволюция белков не сводится только к точечным мутациям. На самом деле, основные изменения набора белков у разноразличных видов несомненно включают все обсуждавшиеся выше типы изменений генома.

Биологи уже давно поняли, что в эволюции действуют также факторы *конвергенции*. Эта концепция заключается в том, что возникновение аналогичных структур и механизмов, а также определенной гомологии последовательности может осуществляться пу-

тем эволюции различающихся структур. Механизмы работы крыльев насекомых и птиц различны, и крылья имеют совершенно различную структуру, но выполняют одну и ту же функцию. Имеется много типов ферментов, катализирующих реакции с использованием молекулярного кислорода, но проводящих эту реакцию различными способами, причем эти ферменты структурно неродственны. Таким образом, без дополнительных доказательств нельзя предполагать, что белки, выполняющие одну и ту же или аналогичную функцию, гомологичны по структуре. Так, существует много типов ферментов, катализирующих гидролиз пептидной связи. Каждое из семейств этих ферментов имеет особенный механизм и структуру, хотя внутри каждого семейства имеется много ферментов, гомологичных по структуре и механизму, например группа ферментов, включающая панкреатические протеиназы, ферменты системы свертывания крови и т. д. (разд. 27.2.1.3).

В настоящее время известно немного примеров различных типов ферментов, возникших в результате конвергентной эволюции. Субтилизин имеет систему передачи заряда, включающую серин, гистидин и аспарагиновую кислоту; аналогичную систему имеет панкреатические протеиназы (разд. 9.3), хотя эти ферменты резко отличаются по первичной структуре и соответственно по трехмерной структуре. Очевидно, что в этом случае аналогичный механизм возник в результате конвергентной эволюции. Митохондриальный и цитоплазматический типы супероксиддисмутазы (разд. 13.7.5) также иллюстрируют явление конвергенции.

Все позвоночные имеют глутаматдегидрогеназу (разд. 21.4.3.1), состоящую из шести идентичных субъединиц, которая может работать с NAD^+ или NADP^+ . Полная аминокислотная последовательность молекулы фермента коровы и цыплят, а также частичная последовательность ферментов других видов позвоночных свидетельствует о высокой степени гомологии. Дивергенция этого фермента происходила с меньшей скоростью, чем у цитохрома *c*, но с большей скоростью, чем у гистона H4 (разд. 27.2). У *Neurospora crassa* две глутаматдегидрогеназы. Одна из них специфична к NADP^+ ; известно, что ее последовательность и структура из шести субъединиц явно гомологичны ферменту позвоночных. Другой фермент из *Neurospora* специфичен к NAD^+ и состоит из четырех идентичных субъединиц, каждая из которых по размеру почти вдвое превышает субъединицу первой глутаматдегидрогеназы. Более того, аминокислотная последовательность NAD -специфичного фермента совершенно отлична от таковой для NADP -специфичного, за исключением некоторого сходства вблизи активных участков. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что все глутаматдегидрогеназы функционируют по аналогичному механизму, хотя из-за различия последовательности следует думать, что два фермента *Neurospora* возникли из различных исходных генов.

27.4. Популяционные изменения и жизнеспособность

У потомства диплоидных организмов одинаковые геномы имеют только идентичные близнецы. В пределах вида имеется значительная гетерозиготность, например генные варианты в каждой паре аллеломорфных генов. Кроме того, обнаружено, что имеется некоторая избыточность, например, за счет дубликации генов. Электрофоретические профили показывают наличие изоферментов во многих тканях и у различных организмов. Благодаря половому скрещиванию происходит постоянное перераспределение генов в популяции внутри вида. Естественный отбор действует на всю популяцию вида и на весь геном в зависимости от фенотипической адаптации к конкретным условиям окружающей среды.

Для человеческой популяции можно привести один пример, свидетельствующий о том, что генетические изменения в одних условиях могут быть губительными, а в других давать селекционные преимущества. До появления инсектицида ДДТ малярия занимала первое место среди причин смертности. Малярийный паразит, разносимый комарами, проводит часть своего жизненного цикла в эритроцитах. Некоторые генетические варианты гемоглобина человека (гл. 31) приводят к микроцитарной анемии, т. е. к эритроцитам меньших размеров, чем нормальные, что эффективно задерживает рост малярийного паразита. В связи с этим индивидуумы, гетерозиготные по HbS и HеС в различных районах Африки, HbP_{Penjab} в Индии, HbE в других районах Азии и талассемии различного типа в Азии и на берегах Средиземного моря, обладают повышенной жизнеспособностью в малярийных районах, а индивидуумы, гомозиготные по нормальному гемоглобину, более восприимчивы к малярии. В некоторых случаях индивидуумы, гомозиготные по модифицированным гемоглобинам, лишены некоторых функций, что понижает их жизнеспособность. Из нескольких сотен известных генетических вариантов гемоглобина человека только те, которые дают преимущества в малярийных районах, распространены у большого количества индивидуумов в человеческой популяции.

27.5. Наследственные нарушения метаболизма

Было установлено, что помимо повторяющихся и умеренно повторяющихся последовательностей в каждой клетке человека имеется достаточное количество ДНК, чтобы обеспечить наличие многих тысяч генов. Для многих из этих генов существуют генетические варианты или полиморфизм, который проявляется в росте, пигментации, кровяном давлении и т. д. Некоторые из генетических различий нейтральны, но другие проявляются в больших различиях

способности отвечать на изменения окружающей среды, включая такие, которые приводят к заболеваниям. При некоторых болезнях генетическое различие настолько критично, что может проявляться в виде неспособности противостоять некоторым условиям окружающей среды. Это генетические нарушения, или врожденные ошибки метаболизма (разд. 11.4.2.1).

С 1908 г., когда Гарро собрал данные о немногих известных в то время врожденных ошибках (разд. 11.4.2.1), было описано более 150 метаболических аномалий, и список их непрерывно растет. Сейчас список различных генетически передаваемых аномалий превышает 1000 наименований; биохимическая природа многих из них остается невыясненной. Так как гены кодируют или регулируют только синтез белков, должно быть очевидно, что все генетически наследуемые аномалии должны быть представлены изменениями белков.

Как было показано, многие метаболические дефекты человека обусловлены отсутствием активности одного специфического фермента. В табл. 27.5 перечислены некоторые наследственные нарушения, для которых идентифицирован отсутствующий или модифицированный белок. Особи с такими нарушениями аналогичны микроорганизмам, у которых блокирована одна из метаболических реакций. У людей большинство таких дефектов фенотипически проявляется только при гомозиготном состоянии. У гетерозигот, имеющих один мутантный и один нормальный ген, обычно хватает фермента для удовлетворения потребности клетки. Очевидно, что старая концепция *доминантности* может быть объяснена тем, что нормальный ген в каждой паре обеспечивает синтез достаточного количества белка, необходимого для организма. У гетерозигот с генами нормальной и аберрантной β -цепи гемоглобина, например HbA, HbS, HbM (гл. 31), присутствует примерно одинаковое количество белков каждого типа. Аналогично этому родители детей-галактоземиков имеют примерно 50% нормального количества фермента (галактозо-1-фосфат—уридилтрансферазы).

Большая часть врожденных ферментных аномалий, описанных до сих пор, представляет собой случаи, в которых имеется полный блок какого-либо метаболического пути. Последствия такого блока могут проявляться различным образом: 1) полное отсутствие конечного продукта определенного метаболического пути, например отсутствие меланина при альбинизме (разд. 23.2.11.1); 2) накопление промежуточного метаболита, для которого нет альтернативного пути дальнейшего превращения, например некоторые нарушения накопления гликогена (разд. 15.5.2.1), при которых гликоген образуется нормально, но не может быть использован, или алкаптонурия, при которой накапливается гомогентизиновая кислота (разд. 23.2.1.1); 3) накопление продукта альтернативного, обычно несущественного метаболического пути, как в случае фенилкетону-

Таблица 27.5

Некоторые наследственные нарушения (человека), для которых идентифицированы отсутствующие специфические ферменты или белки^a

Нарушения ^a	Затронутый фермент или белок
Агаммаглобулинемия	γ -Глобулин
Акантоцитоз	β -Липопроteid (низкой плотности)
Акаталазия	Каталаза
Альбинизм	Тирозиназа
Алкаптонурия	Гомогентизатоксидаза
Анальбуминемия	Сывороточный альбумин
Апния, вызванная лекарствами	Псевдохолинэстераза
Аргининемия	Аргиназа
Аргининоянтранная ацидурия	Аргининосукциназа
Аспартилгликозаминурия	Специфическая гидролаза
Атрасферинемия	Трансферин
Афибриногенемия	Фибриноген
Болезнь Вольмана	Кислая липаза
Болезнь Вильсона	Церулоплазмин
Болезнь Зандхофа	N-Ацетил- β -гексозаминидазы A и B
Болезнь недостаточности трипсиногена	Трипсиноген
Болезнь Гаучера	Глюкоцереброзидаза
Болезнь Рефзюма	Фитанат- α -оксидаза
Болезнь Тангье	Недостаточность липопротеидов (высокой плотности)
Болезнь Тей-Сакса	Гексозаминидаза A
Болезнь Фабри	Тригексозилцерамид-галактозилгидролаза
Болезнь Хартнупа	Триптофан-2,3-диоксигеназа
Валинемия	Валинаминотрансфераза
Врожденная недостаточность липазы	Липаза (панкреатическая)
Галактоземия	Галактозо-1-фосфат—уридилтрансфераза
Гарголизм (синдром Хюрлера)	α -L-Идурамидаза
Гемоглобинопатии	Гемоглобины (гл. 31)
Гемолитические анемии	См. гл. 32
Гемофилли	См. гл. 29
Гипераммонемия I	Орнитинтранскарбамоилаза

Продолжение

Нарушения ^a	Затронутый фермент или белок
Гипераммонемия II	Карбамоилфосфатсинтетаза
Гиперглицинемия	Пропионаткарбоксилаза
Гиперлизинемия	Лизин-кетоглутаратредуктаза
Гипероксалурия	
I гликолевая ацидурия	α -Кетоглутарат-глиоксалааткарболигаза
II глицериновая ацидурия	D-Глицератдегидрогеназа
Гиперплазия надпочечников	См. гл. 45
Гиперпролинемия I	Недостаточность пролиноксидазы
Гиперпролинемия II	Δ^1 -Пирролин-5-карбоксилатдегидрогеназа
Гипофосфатазия	Щелочная фосфатаза
Гистидинемия	Гистидаза
Гомоцистинурия	Цистатионсинтетаза
Дефект в образовании тиреоидных гормонов, наследственный семейный зоб	Иодтирозиндегалогеназа
Дефект синтеза альдостерона	18-Гидроксилаза
Диабет (младенческий)	Инсулин
Желтуха новорожденных	Глутатионпероксидаза
Зоб (семейный)	Иодтирозиндегалогеназа
Заболевание «моча — кленовый сироп»	Декарбоксилаза кетокислот
Изовалерацидемия	Изовалерат-СоА-дегидрогеназа
Карликовость	Соматотропин (гормон роста)
Карнозинемия	Карнозиназа
Ксантинурия	Ксантиноксидаза
Ксантуреновая ацидурия	Кинуреназа
Лактозилцерамидоз	Лактозилцерамидгалактозилгидролаза
Лейкодистрофия Краббе	Галактозилцерамид- β -галактозилгидролаза
Маннозидоз	α -Маннозидаза
Метахроматическая лейкодистрофия	Арилсульфатаза А (сульфатидатсульфатаза)
Метгемоглобинемия	NADH-Метгемоглобинредуктаза
Метилмалоновая ацидурия (два типа)	Метилмалонил-СоА-карбоксимутаза
Младенческая непереносимость лактозы	Лактаза

Нарушения ^a	Затронутый фермент или белок
Нарушения содержания гликогена (девять типов)	См. табл. 15.3
Недостаточность галактокиназы	Галактокиназа
Недостаточность кислой фосфатазы	Лизосомная кислая фосфатаза
Недостаточность лактазы кишечника взрослых	Лактаза
Недостаточность миелопероксидазы с рассеянными кандидиозом	Миелопероксидаза
Недостаточность сульфитоксидазы	Сульфитоксидаза
Недостаточность формиминотрансферазы	Формиминотрансфераза
Непереносимость фруктозы	Фруктозо-1-фосфат—альдолаза
Недостаточность холестерина эфиров (болезнь Норуна)	Фосфатидилхолин-холестеринацил-трансфераза
Некротизирующая энцефаломиелопатия Лейфа	Пируваткарбоксилаза
Непереносимость дисахаридов	Сахараза, мальтаза или лактаза
Непереносимость лизина	L-Лизин-NAD-оксидоредуктаза
Непереносимость сахарозы	Сахараза, изомальтаза
β -Оксивалериановая ацидурия (и β -метилкротонилглицинурия)	β -Метилкротонил-CoA-карбоксилаза
Оксипролинемия	Оксипролиноксидаза
Оротацидурия	Оротидилатпирофосфорилаза и оротидилатдекарбоксилаза
Пентозурия	L-Ксилулозодегидрогеназа
Пиридоксинзависимые конвульсии детей	Глутаматдекарбоксилаза
Пиридоксинобусловленная анемия	δ -Аминолевулинатсинтаза
Пироглутаминовая ацидурия	Пироглутаматгидролаза
Подагра первичная (одна форма)	Гипоксантин-гуанинфосфорибозил-трансфераза
Порфириаз	См. гл. 32
Рахит, устойчивый к витамину D	Холекальцифераза
Саркозинемия	Саркозиндегидрогеназа
Синдром Криглера-Найяра	Глюкуронилтрансфераза
Синдром Леш-Нихана	Гипоксантин-гуанинфосфорибозил-трансфераза
Синдром Санфилиппо А	Гепарансульфатсульфатаза

Продолжение

Нарушения ^а	Затронутый фермент или белок
Синдром Санфилиппо В	N-Ацетил- α -D-глюкозаминидаза
Тирозинемия I	n-Оксифенилпируватоксидаза
Тирозинемия II	Тирозинаминотрансфераза
Фавизм, чувствительность к примакхину, синдром несфероцитической гемолитической анемии	Глюкозо-6-фосфат—дегидрогеназа
Феминизация	Δ^1 -5 α -Редуктаза
Фенилкетонурия	Фенилаланингидроксилаза
Фруктозурия	Фруктокиназа печени
Фукозидоз	Фукозидаза
<i>Xeroderma pigmentosa</i>	Репарационная эндодезоксирибонуклеаза
Цистатионинурия	Цистатионаза
Цитрулинемия	Аргининосукцинат-синтетаза
Эмфизема легких	α_1 -Антитрипсин

^а Разделы книги, в которых обсуждается большинство из этих нарушений, можно найти по предметному указателю.

рии (разд. 21.4.2.4), ведущее к выделению больших количеств соединения, которое обычно выделяется в следовых количествах; 4) отсутствие ферментов расщепления, что приводит к накоплению в тканях избыточного количества нормальных компонентов, образование которых продолжается, как при различных гликофинголипидодистрофиях (разд. 18.2.7), или 5) наличие аномально большого количества фермента, приводящее к избыточному превращению субстрата по одному из нескольких путей в ущерб другим путям. Это имеет место при врожденной гемолитической анемии, при которой образуется в 50—70 раз больше *аденозиндезаминазы*, чем в нормальных эритроцитах, что приводит к понижению уровня различных производных аденозина, включая АТР, и т. д., в эритроцитах.

Кроме генетических аномалий, которые могут быть приписаны отсутствию или модификации отдельных белков и ферментов, существует множество врожденных нарушений метаболизма, для которых еще не идентифицированы затронутые белки; некоторые из них перечислены в табл. 27.6. По мере увеличения знаний по биохимии безусловно будут идентифицированы белки, изменения которых являются причиной этих нарушений. Более того, по мере

Таблица 27.6

Некоторые нарушения, для которых не идентифицированы затронутые белки

Нарушения	Биохимические проявления
Врожденная стеаторрея	Утрата способности переваривать и/или абсорбировать липиды
Цистинурия	Экскреция цистина, лизина, аргинина и орнитина
Цистиноз	Неспособность использовать аминокислоты, особенно цистин, изменение транспорта аминокислот в клетку
Синдром Фанкони	Повышенное выделение аминокислот
Гипомагнеземия	Утрата способности абсорбции Mg^{+2} кишечником
Лактатный ацидоз (врожденный)	Пониженный глюконеогенез; вероятно, несколько форм

уточнения количественных различий метаболизма этот список будет увеличиваться. Как и в случае аномальных гемоглобинов, где физиологические последствия модификации белков могут быть ничтожны или сильно выражены, можно ожидать такие же открытия и для других измененных белков и ферментов.

27.5.1. Хромосомные аномалии

Кроме аномалий, перечисленных в табл. 27.5, существуют и другие дефекты, которые обусловлены аномальным количеством хромосом. При *синдроме Дауна* аутомсомный набор из 21 хромосомы находится в триплоидном, а не в диплоидном состоянии. Известны также индивидуумы, у которых отсутствует Y-хромосома (синдром Тернера). У женщин этот синдром проявляется глухотой, задержкой умственного развития, деформацией сердца и утратой способности достигать половой зрелости. При синдроме Клейнфельтера XXУ индивидуумы являются мужчинами, но не способны к половому созреванию и часто умственно неполноценны. Так как X- и Y-хромосомы несут гены, ответственные за половую дифференцировку, не удивительно, что у этих индивидуумов вышеперечисленные синдромы ассоциированы с аномалиями полового развития. Гормоны, связанные с нормальным половым развитием, являются стероидами (гл. 44), и влияние полисомии или недостатка половых хромосом дает основание предполагать, что некоторые гены, участвующие в синтезе стероидов, могут находиться в X- или Y-хромосомах.

В заключение обсуждения наследственных нарушений человека необходимо сделать замечания относительно некоторых аспектов

исследования генетики человека. В начале этого века, когда вновь были открыты законы Менделя, было проведено много генетических исследований различных признаков людей. Вскоре стало очевидно, что не все физические, физиологические и метаболические характеристики, приписанные генетическим различиям, на самом деле наследственные. Сложности возникли вследствие многих факторов. Человеческие семьи малы по сравнению с семьями лабораторных животных, и невозможно получить точные данные более чем для немногих поколений. Популяции очень подвижны, что часто делает затруднительным или невозможным изучение всех членов семьи. Часто социальные факторы и окружающая среда, которые в основном неконтролируемы, могут симулировать генетические факторы.

Эти предостерегающие замечания необходимы, так как при изучении генетики человека было составлено множество бессмысленных родословных. В связи с этим следует отметить, что рахит — нарушение, обусловленное недостатком витамина D или недостаточным облучением солнечным светом (гл. 51), долгое время приписывался генетическим факторам. Аналогично этому зоб, одно время распространенный в некоторых районах Швейцарии и в так называемом «зобном поясе» США, считался наследственным. В настоящее время выяснено, что этиологическим фактором, приводящим к развитию увеличенных тиреоидных желез, является один из факторов окружающей среды — недостаток йода. Тем не менее было установлено, что одна из форм зобной болезни наследственна (гл. 42). Очевидно, что и в других случаях, как и для зобной болезни, необходимо учитывать при анализе всю сумму факторов, которые могут быть ответственны за метаболические аномалии, чтобы определить конкретный вклад генетических факторов, питания и других факторов окружающей среды. Далее усилия должны быть направлены на изучение того, каким методом можно исправить проявление генетического нарушения. Успехи, достигнутые в случае галактоземии (разд. 15.7.5) удалением галактозы из пищи детей, в случае фенилкетонурии — ограничением содержания фенилаланина в пище (разд. 21.4.2.4), в случае болезни Рефsuma — удалением фитановой кислоты (разд. 17.5.7) и в случае диабета — введением инсулина или при подагре — введением ингибитора ксантиноксидазы (разд. 27.2), свидетельствуют о достижимости решения этих проблем. Другим подходом к лечению этих расстройств является введение «недостающего фермента», которое может быть осуществлено клетками, содержащими избыточное количество задержанного метаболита, как в случае гликолипосфинголипидоза (разд. 18.2.7).

С другой стороны, такие успехи порождают социальные и моральные проблемы, возникающие перед обществом вследствие того, что эти успехи с очевидностью ведут к увеличению частоты

испорченных генов в общей популяции. Даже введение нормальных генов в соматические клетки таких индивидуумов, например, с помощью трансдукции (разд. 25.2.1) не может уменьшить остроту этой проблемы.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

- Brock D. J. H., Mayo O.*, eds. *The Biochemical Genetics of Man*, Academic Press, Inc., New York, 1972.
- Bryson V., Vogel H. J.*, eds. *Evolving Genes and Proteins*, Academic Press, Inc., New York, 1965.
- Garrod A. E.* *Inborn Errors of Metabolism* reprinted with supplement by H. Harris, Oxford University Press, Fairlawn, N. J., 1963.
- Harris H.* *The Principles of Human Biochemical Genetics*, 2d ed., American Elsevier Publishing Company, Inc., New York, 1975.
- Jukes T. H.* *Molecules and Evolution*, Columbia University Press, New York, 1966.
- McKusick V. A.* *Mendelian Inheritance in Man: Catalogs of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive and X-linked Phenotypes*, 4th ed., The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1975.
- Slater E., Cowie V.* *The Genetics of Mental Disorders*, Oxford University Press, London, 1971.
- Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S.*, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 3d ed., McGraw-Hill Book Company, New York, 1972.

Обзорные статьи

- DeLange R. J., Smith E. L.* Histones, *Annu. Rev. Biochem.*, 40, 279—314, 1971.
- Dixon G. H.* Mechanisms of Protein Evolution, pp. 147—204, in P. N. Campbell and G. D. Greville, eds. *Essays in Biochemistry*, vol. 2, Academic Press, Inc., New York, 1966.
- FASEB Conference, Genetics and Biological Evolution, *Fed. Proc.*, 35(10), 2077—2204, 1976.
- Raivio K. O., Seegmiller J. E.* Genetic Diseases of Metabolism, *Annu. Rev. Biochem.*, 41, 543—576, 1972.
- Smith E. L.* Evolution of Enzymes, pp. 267—339, in: P. D. Boyer, ed. *The Enzymes*, 3d ed., vol. 1, Academic Press, Inc., New York, 1970.

Глава 28

ВИРУСЫ

Вирусы были обнаружены в конце XIX в. как агенты, вызывающие инфекционные заболевания растений и животных. В связи с их значением для сельского хозяйства и медицины их вначале исследовали ботаники и патологи. Вирусы заинтересовали биохимиков тогда, когда стало ясно, что, несмотря на относительно простой геном, вирусы могут служить модельной системой для анализа репликации нуклеиновых кислот и экспрессии генов (гл. 25 и 26). Так как простейшие вирусы состоят только из нуклеиновой кислоты и белка, они представляют собой также прекрасную модель для изучения сборки клеточных органелл.

В свободном состоянии вирусы представляют собой нуклеиновую кислоту, ДНК или РНК, окруженную белковой оболочкой. Некоторые вирусы покрыты снаружи мембранным слоем, состоящим из гликопротеинов и липидов. Попадая вовнутрь клетки-хозяина, нуклеиновая кислота может реплицироваться автономно или интегрировать в хозяйскую нуклеиновую кислоту и реплицироваться совместно с геномом-хозяином.

Ввиду большого разнообразия трудно дать простое и точное определение вируса. Однако вирусы обладают свойствами, которые четко отличают их от всех прочих микроорганизмов: 1) они содержат только один вид нуклеиновой кислоты — или РНК, или ДНК. Некоторые из них уникальны в том отношении, что используют в качестве генетического материала не ДНК, а РНК. 2) у них нет рибосом и других клеточных органелл, они лишены систем генерации энергии. В связи с этим они должны полностью зависеть от систем тех клеток, которые они инфицируют, для получения предшественников репликации и для размножения.

28.1. Цикл размножения вирусов

Несмотря на то что известные вирусы широко различаются по структуре, их циклы размножения весьма похожи и состоят из следующей последовательности событий: 1) вирусная частица, назы-

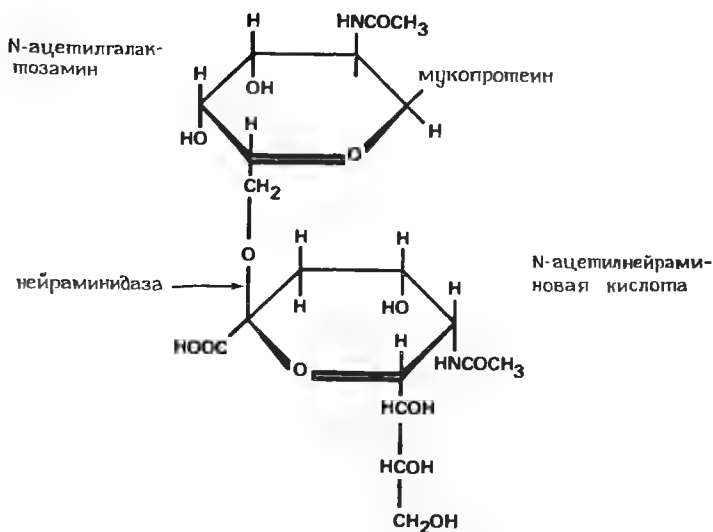


Рис. 28.1. Структура рецептора вируса гриппа.

ваемая *вирион*, присоединяется к поверхности клетки-хозяина; затем через клеточную мембрану проникает либо интактный вирус, т. е. нуклеиновая кислота в своей белковой оболочке (многие вирусы животных и растений), либо одна нуклеиновая кислота (бактериальные вирусы); 2) синтез вирусных белков направляется инфицировавшей вирусной нуклеиновой кислотой, и вирусная нуклеиновая кислота реплицируется. Способ синтеза мРНК и специфика репликации зависят от природы и количества нуклеиновой кислоты в вирионе; 3) новые вирионы состоят из вновь синтезированных белков и нуклеиновых кислот; 4) образовавшиеся вирионы выходят из клетки либо в результате лизиса клетки, либо проходя через клеточную мембрану без лизиса клетки.

Вирусы всегда присоединяются к специфическим группам макромолекул (*рецепторам*), расположенным на поверхности клеток-хозяев. Способность вируса инфицировать определенный тип клеток часто определяется на этой стадии. Так, *T-четные бактериофаги* (см. ниже) связываются со специфическими липополисахаридами клеточной стенки *E. coli*, а *полиовирус* размножается исключительно в специфических клетках человека и обезьяны, так как только эти клетки имеют специфический липопротеидный рецептор на клеточной мембране. Структура рецептора вируса *гриппа*, имеющегося на поверхности клеток слизистой дыхательных путей и эритроцитов, показана на рис. 28.1.

Как ДНК, так и РНК в одно- и двухнитевой форме может служить генетическим материалом для различных вирусов (табл. 28.1).

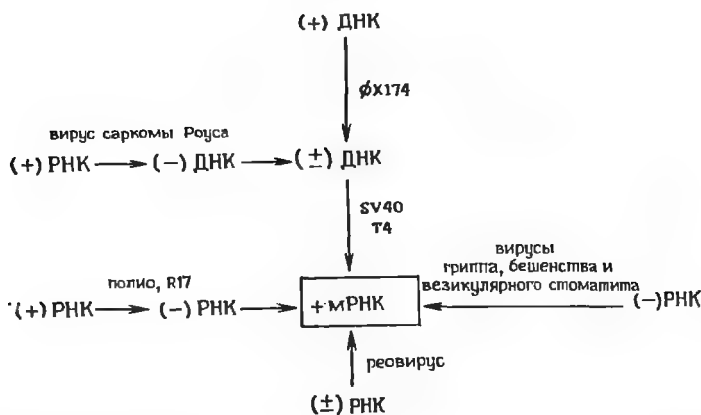


Рис. 28.2. Схема синтеза мРНК после инфекции различными вирусами. (Ballimore D., Bacteriol. Rev., 35, 235, 1971).

В зависимости от природы вирусной нуклеиновой кислоты синтез мРНК идет по одному из путей, показанных на рис. 28.2; знак плюс относится к последовательности мРНК, а знак минус относится к комплементарной цепи.

Бактериофаги T4, T7 и λ, аденовирус, вирус S40 и вирус оспы содержат двухнитевую ДНК, и (+) мРНК синтезируется с использованием в качестве матрицы фрагментов обеих цепей (гл. 26). У бактериофага $\phi X174$, который содержит однонитевую кольцевую ДНК, сначала синтезируется комплементарная копия и образовавшийся дуплекс используется для синтеза (+) мРНК. У полиовируса и бактериофага R17, которые содержат однонитевую РНК*, сначала синтезируется комплементарная копия РНК [(-) РНК], которая затем используется в качестве матрицы для синтеза (+) мРНК. РНК-содержащий онкогенный вирус, который вызывает саркому Роуса, дает сначала однонитевую ДНК-копию вирусной РНК (гл. 25), на которой затем образуется двухнитевая ДНК. Последняя служит матрицей для образования (+) мРНК. Наконец, РНК-содержащие вирусы гриппа, свинки, кори, бешенства и везикулярного стоматита содержат (-) РНК, на которой и синтезируются (+) мРНК.

Общее правило, которое вытекает из анализа большого числа вирусов, заключается в том, что если для синтеза мРНК требуется фермент (полимераза), отсутствующий в клетке-хозяине, то этот фермент содержится в вирионе и проникает в клетку-хозяина вме-

* В этих случаях вирусный геном представляет собой (+) мРНК, так что синтез вирусных белков идет и до начала репликации вирусной РНК. — Прим. пер.

Таблица 28.1
Нуклеиновые кислоты некоторых вирусов

Нуклеиновая кислота вириона	Вирус	Величина генома, ×10 ³ оснований
Однонитевая РНК	Полновирус	6
	Саркома Роуса	10
	Бешенство	16
	Везикулярный стоматит	16
Двухнитевая РНК	Реовирус	23
Однонитевая ДНК	Малый вирус мышей	5
	φX174	5,4
Двухнитевая ДНК	SV40	5
	Папиллома (бородавка)	8
	Аденовирус	36
	Бактериофаг λ	46
	Бактериофаг T4	120
	Герпес	156
	Оспа	240

сте с вирусной нуклеиновой кислотой. Синтез мРНК вирусов гриппа, бешенства, везикулярного стоматита, реовируса и саркомы Роуса иллюстрирует это правило (рис. 28.2).

Обрисовав общие черты размножения вирусов и синтеза мРНК, рассмотрим репликацию некоторых основных классов вирусов, перечисленных выше.

28.2. Вирусы с двухнитевой ДНК

28.2.1. Бактериофаг T4

Бактериофаг T4 является одним из группы «Т-фагов» (от T1 до T7), которые инфицируют *E. coli*. Благодаря короткому циклу репликации и простоте культивирования на клетках-хозяевах фаг T4 является одним из наиболее изученных вирусов. Как и другие бактериофаги, T4 состоит только из белковой оболочки и ДНК. Вирус (рис. 28.3) имеет довольно сложную морфологию и состоит из икосаэдрической головки, в которой тесно упакована ДНК, и полого цилиндрического хвоста, представляющего собой

футляр с пустотелым сердечником. Хвост соединен с головкой коротким воротничком. На основании хвоста расположена базальная пластинка, с которой связаны шипы или шпильки и группа из шести тонких нитей. Проникновение вирусной нуклеиновой кислоты в бактерию-хозяина происходит в следующем порядке: фаж связывается с бактерией с помощью хвостовых нитей и концы хвостовых шпилек фиксируются на клеточной стенке. Сложная последовательность стадий, приводящая к сокращению футляра, сопряжена с гидролизом АТР до АДФ и P_i и внедрением сердечника в клеточную стенку. Затем ДНК впрыскивается из головки вируса через сердечник внутрь клетки.

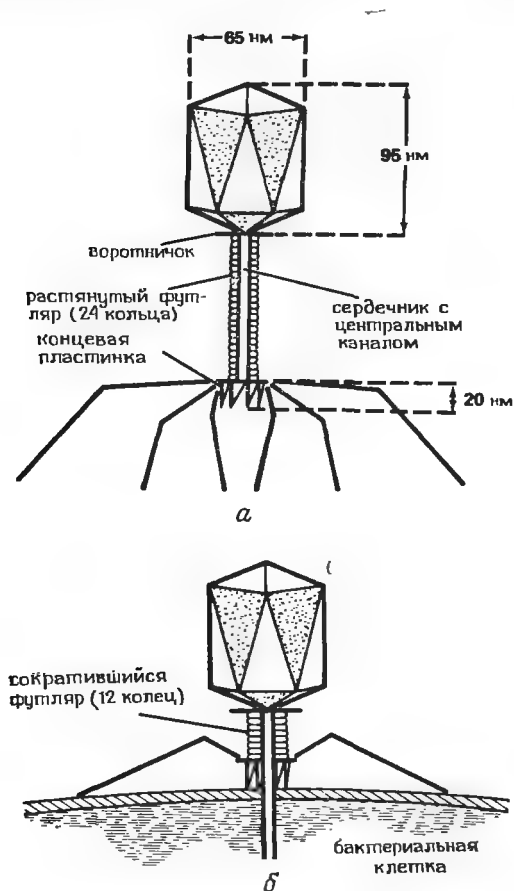


Рис. 28.3. Схема, показывающая (а) составные части бактериофага Т4 и (б) механизм проникновения его сквозь клеточную стенку. (Лурия С. Е., Дарнел Д. Е., Общая вирусология. — М.: Мир, 1971.)

ДНК фага Т4 представляет собой линейный дуплекс ($M 120 \cdot 10^6$), содержащий $1,66 \cdot 10^5$ нуклеотидных пар. Необычно то, что цитозин в ДНК этого фага полностью заменен глюкозилированным 5-оксиметилцитозином (табл. 25.2), который, вероятно, служит для защиты вирусной ДНК от дезоксинуклеаз, индуцируемых после инфицирования клетки. Ферментативный механизм, приводящий к замещению цитозина глюкозилированным 5-оксиметилцитозином, был описан выше (гл. 25). Другой необычной чертой фага Т4 является то, что в популяции Т4 последовательности ДНК циркулярно переставлены по отношению друг к другу (пермутированы). Иначе говоря, различные молекулы начинаются и заканчиваются в различных точках общей последовательности. Это свойство определяет циркулярность карты генетических связей этого фага, имеющего линейную ДНК (рис. 28.4). Помимо циклической перестановки каждая молекула ДНК Т4 обладает концевой избыточностью, т. е. последовательность на одном конце повторяет последовательность на другом. Таким образом, каждая молекула содержит несколько больше, чем один эквивалент геномной ДНК. Степень избыточности составляет примерно 2% генома Т4.

Генетическая карта Т4 приведена на рис. 28.4. До сих пор идентифицировано 135 генов, которые составляют примерно 90% кодирующей емкости генома Т4. Эти гены можно разделить на два больших класса. Один из них определяет ферменты, необходимые для деградации ДНК клетки-хозяина и быстрого синтеза Т4 ДНК, включая дезоксицитидинтрифосфатазу, дезоксинуклеотидкиназу, дезоксицитидилатоксиметилазу, глюкозилтрансферазы, различные дезоксирибонуклеазы, ДНК-полимеразу, ДНК-лигазу и ДНК-связывающий белок. Второй класс определяет белки, необходимые для сборки фаговой частицы. Следует отметить, что различные гены, за небольшим исключением, группируются в соответствии с функциями. В отличие от генов *E. coli*, участвующих в метаболизме и синтезе лактозы и триптофана соответственно, группы генов Т4 не образуют опероны, и их экспрессия не контролируется координированно, например путем образования полигенной мРНК.

Размножение фага Т4 завершается за 20 мин при 30 °С. После адсорбции фага и проникновения ДНК синтез макромолекул клетки-хозяина резко прекращается, и примерно через 5 мин начинается транскрипция некоторых фаговых генов. Транскрипты комплементарны только одной из нитей инфицирующей молекулы ДНК фага Т4 и определяют ранние ферменты, необходимые для репликации генома Т4, в частности ДНК-полимеразу. Вскоре после начала синтеза вирусной ДНК, на седьмой минуте после инфицирования, появляется новый класс транскриптов. Эти пострепликативные, или *поздние* мРНК, комплементарны нити, противоположной той нити, с которой считывались ранние мРНК, и кодируют главным образом структурные белки фага. Синтез ранних мРНК за-

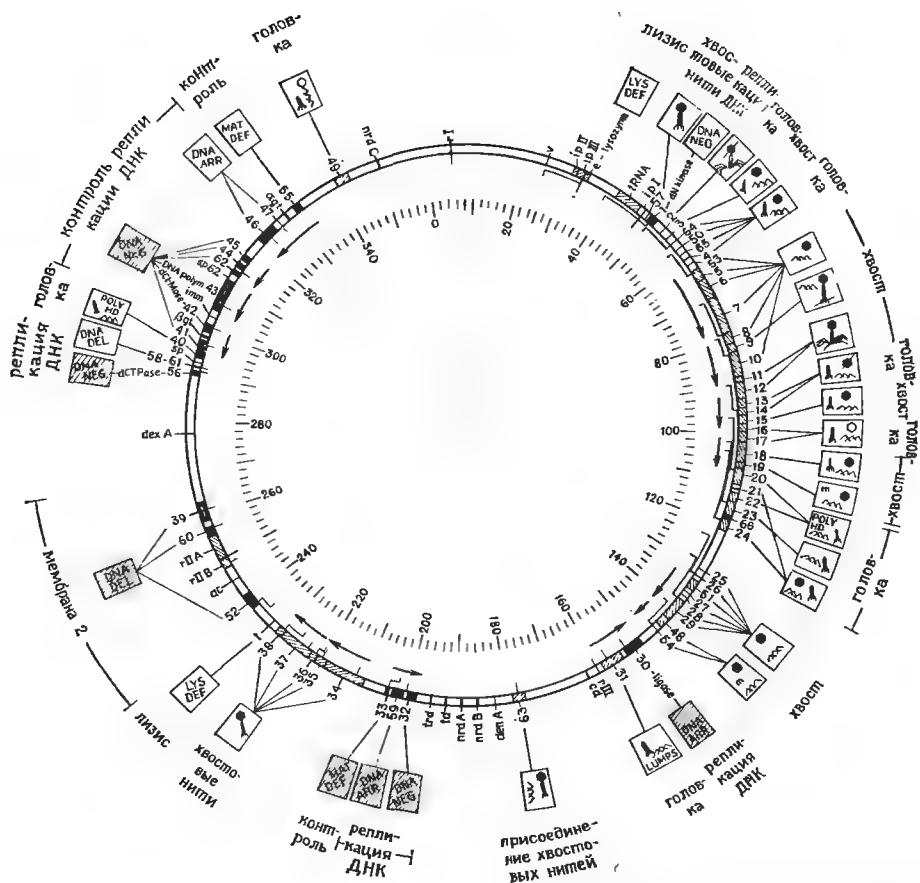


Рис. 28.4. Карта генома бактериофага Т4. Гены, отмеченные штриховкой, участвуют в морфогенезе фага, в виде сплошной черной области представлены гены, участвующие в метаболизме нуклеиновых кислот. (Wood W., в кн.: Handbook of Genetics (R. C. King, ed.), p. 328, Plenum Press, New York, 1973.)

медляется или прекращается при включении поздней транскрипции. Однако третий класс мРНК, называемый *квазипоздным*, который с малой скоростью синтезируется и на ранней стадии, образуется с резко увеличенной скоростью во время позднего периода. Квазипоздные мРНК определяют некоторые ферменты, необходимые для репликации ДНК, например дезоксирибонуклеотидкиназу, а также компоненты, необходимые для сборки фаговой частицы.

Механизм переключения транскрипции ранних, поздних и квазипоздних мРНК и, следовательно, упорядочивающий последова-

тельность синтеза белков, необходимых для размножения бактериофага Т4, до сих пор неизвестен. Известно, однако, что происходит вирус-индуцированная модификация хозяйской РНК-полимеразы, в частности перенос аденозиндифосфорибозного остатка NAD^+ на специфический аргининовый остаток α -субъединицы РНК-полимеразы. Возможно, что такая модификация изменяет способность РНК-полимеразы узнавать промоторные последовательности ранних и поздних генов и, таким образом, регулирует переключение транскрипции с одного класса генов на другой.

По мере накопления новых молекул ДНК начинается сборка зрелых вирионов Т4. Последний содержит 36 различных структурных белков, правильная сборка которых требует участия 55 генов. Так как она идет со сравнительно высокой эффективностью *in vitro*, сборка Т4 служит моделью морфогенеза сложных надмолекулярных структур, например субклеточных органелл. Процесс сборки, воссозданный на основе электронной микроскопии промежуточных продуктов и исследований сборки *in vitro*, идет в определенной последовательности, которая направляется взаимодействием продуктов генов, т. е. белков. Общий путь состоит из трех направлений, ведущих независимо к образованию головки, хвоста и хвостовых члеников, которые затем объединяются, как показано на рис. 28.5.

Хотя вначале предполагалось, что образование зрелого вириона фага Т4 происходит практически только путем самосборки, в настоящее время ясно, что существуют и каталитические этапы. По крайней мере одна из стадий заключается в расщеплении предшественника основного капсидного белка (M 55 000) с образованием белка с M 45 000. Из 55 генов, участвующих в процессе сборки, 7 определяют неструктурные вспомогательные белки, которые каким-то образом способствуют или направляют сборку. Еще 12 генных продуктов необходимы на разных стадиях процесса сборки, но неизвестно, играют они структурную или вспомогательную роль.

После завершения сборки зрелого вириона происходит лизис клетки и высвобождение нескольких сотен фаговых частиц. Этот процесс ускоряется, в частности, фагоиндуцированным *эндолизин*ом.

28.2.2. Обезьяний вирус 40

Обезьяний вирус 40 (SV40) является одним из *паповавирусов*, включающих также вирусы *полиомы* и *папилломы*. SV40 содержит только белок (88%) и ДНК (12%). Вирион содержит одну молекулу циклической двухнитевой ДНК размером 5100 пар оснований (M $3,6 \cdot 10^6$). Как и другие циклические (циркулярные) ДНК, она существует в суперскрученной конформации (гл. 7). ДНК SV40

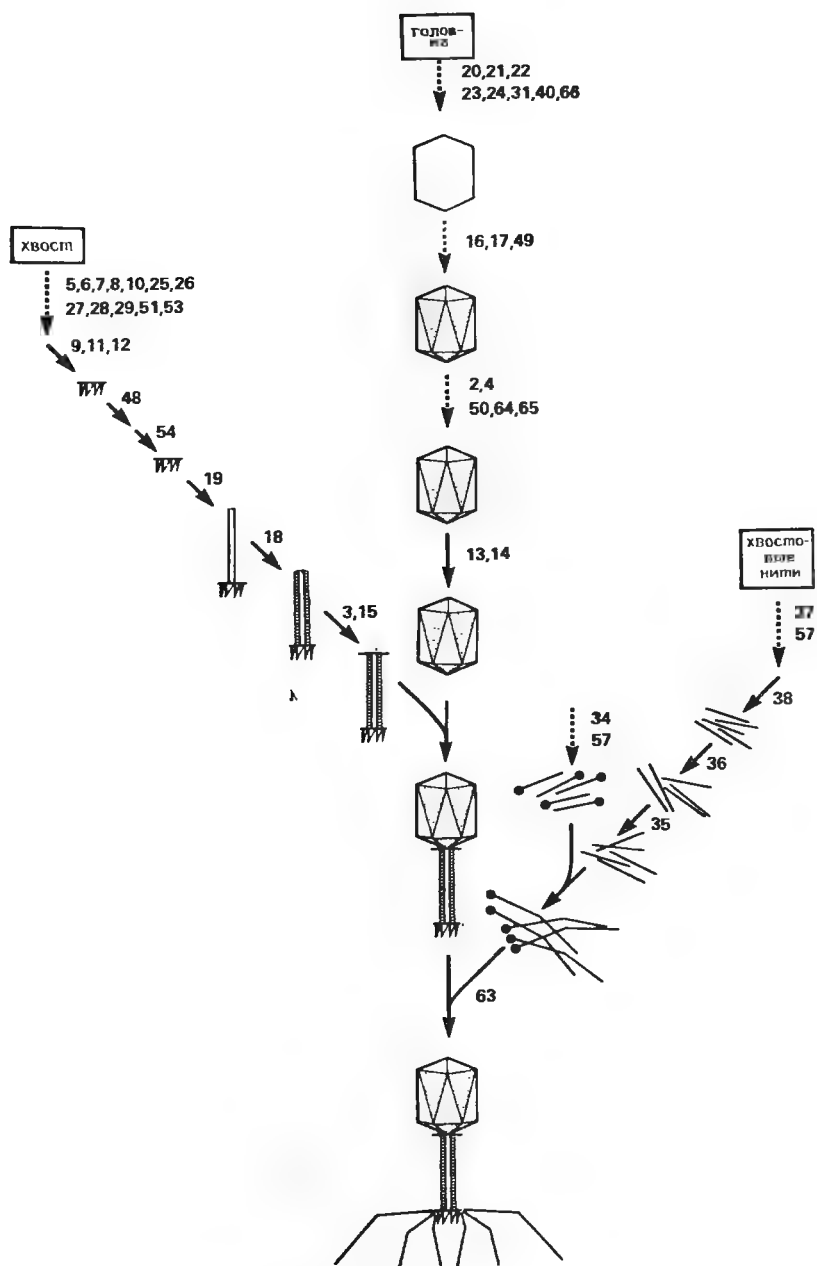


Рис. 28.5. Сборка бактериофага Т4. Цифры показывают номера генов, необходимых для соответствующих стадий этого процесса. (Wood W., Bishop R. J., в кн.: Virus Research (C. F. Fox, W. S. Robinson, eds.), p. 303, Acad. Press, New York, 1973.)

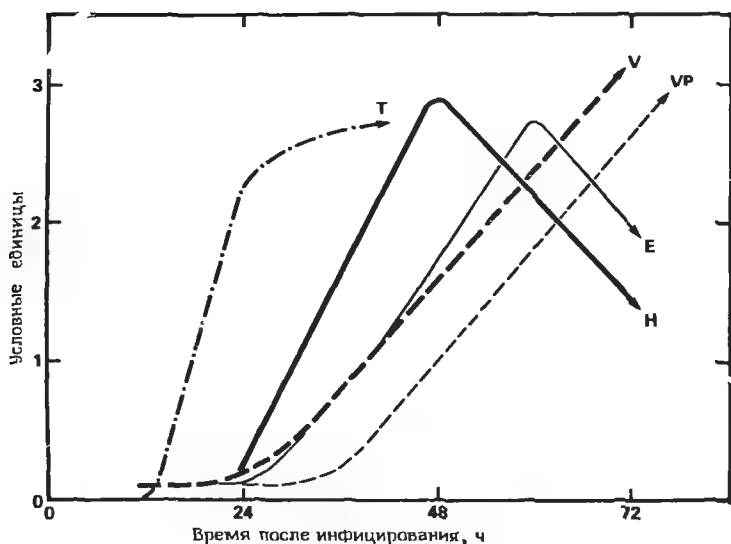


Рис. 28.6. Ход синтеза макромолекул во время продуктивной инфекции клеток почки обезьяны вирусом SV40. Т — Т-антиген; Н — хозяинская ДНК; V — вирусная ДНК; VP — вирусное потомство; E — ферменты. (Toozе J., Molecular Biology of Tumor Viruses, p. 306, Cold Spring Harbor, N. Y., 1973.)

окружена оболочкой, состоящей из трех белков — VP1, VP2 и VP3, каждый из которых кодируется вирусом. Кроме того, вирусная ДНК ассоциирована с клеточными гистонами H2A, H2B, H3 и H4 (гл. 25).

Инфицирование обезьяньих клеток в культуре (пермиссивный хозяин) вирусом SV40 вызывает литический цикл, приводящий к лизису клеток и высвобождению вирусного потомства. Инфицирование *непермиссивного* хозяина, например мышинных клеток, является абортивным, и вирусное потомство не образуется.

Последовательность событий, происходящих во время продуктивной инфекции клеток почек обезьяны вирусом SV40, показана на рис. 28.6. Первой стадией, которая длится примерно 1 ч, являются адсорбция вируса, вхождение его в клетку в виде пиноцитозного пузырька, внедрение в ядро и удаление капсидных белков (*раздевание*). Затем происходит транскрипция так называемых ранних генов инфицировавшей SV40 ДНК. Трансляция ранних транскриптов приводит к образованию вирусспецифического белка *Т-антигена*, который появляется в ядре инфицированной клетки. Функции Т-антигена неизвестны, он был идентифицирован только по иммунохимической активности. Однако Т-антиген специфически связывается с точкой начала репликации ДНК SV40 (рис. 28.7), а температурочувствительные мутанты по А-гену, про который из-

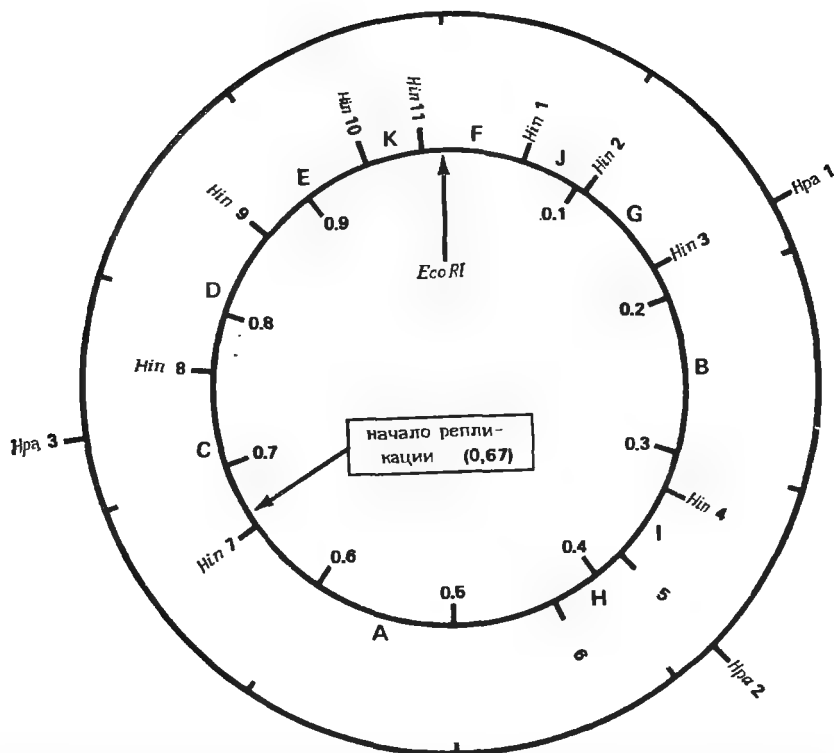


Рис. 28.7. Карта расщепления рестрикционными эндонуклеазами ДНК SV40. Со-
 кращения рестрикционных нуклеаз: *Hin* — *Hemophilus influenzae*, *Hpa* — *Hemophi-*
lus parainfluenzae, *EcoRI* — рестрикционная нуклеаза I. Дробные цифры показы-
 вают относительное расстояние от единственного места расщепления *EcoRI*, услов-
 но обозначенного 0,0. Места расщепления рестрикционными нуклеазами показаны,
 так: *Hin1*, *Hpa1* и т. д. См. также табл. 25.3. (Nathan D., Adler S. P., Brock-
 man W. W., Danna K. J., Lee T. N. H., Sack G. H., в кн.: *Virus Research* (C. F. Fox,
 W. S. Robinson, eds.), p. 61, Acad. Press, New York, 1973.)

вестно, что он необходим для вирусной репликации, образуют Т-антиген, который, как было установлено по иммунохимической активности, инактивируется при непермиссивной температуре. Во время этой ранней фазы инфекционного цикла активность некоторых хозяйских ферментов, участвующих в синтезе ДНК, увеличивается, вероятно, за счет синтеза *de novo*. Среди этих ферментов — ДНК-полимераза, ДНК-лигаза, тимидинкиназа и дезоксицитидиндезаминаза. Затем происходит увеличение скорости синтеза хозяйской ДНК, и в это же время или несколько позже начинается репликация вирусной ДНК. Репликация ковалентнозамкнутой циркулярной ДНК вируса SV40 начинается в уникальной точке и

идет в обе стороны, заканчиваясь в точке, отстоящей на 180° от точки начала репликации, что весьма похоже на полуконсервативную репликацию циркулярной хромосомы *E. coli* (гл. 25).

Одновременно с началом репликации вирусной ДНК начинается транскрипция поздних вирусных генов, которые определяют капсидные белки. Нить ДНК, с которой идет транскрипция поздних генов, противоположна той, с которой идет транскрипция ранних генов. И в этом случае неизвестен механизм, регулирующий переключение от ранней к поздней транскрипции во время литического цикла SV40. Затем происходит сборка вирионов потомства из ДНК и капсидных белков, последующий лизис хозяйской клетки и высвобождение инфекционных вирусных частиц.

Ранее уже обсуждалось то, что инфекция вирусом SV40 пермиссивных клеток является абортивной. Вирус начинает инфекцию, и протекают все ранние события, описанные для литического цикла, вплоть до синтеза Т-антигена и индукции репликации хозяйской ДНК. Однако репликация вирусной ДНК не происходит и вирусное потомство не образуется. В этих условиях большая часть клеток выживает, но небольшая часть выживших клеток *трансформируется* и малигнизируется. Такие трансформированные клетки проявляют наследственные изменения некоторых свойств, например, растут менее упорядоченно и теряют способность к контактному торможению роста, а будучи введенными подходящему животному, вызывают опухоль. Введение животным SV40 также может вызвать опухоли.

Различные методы гибридизации нуклеиновых кислот показали, что трансформированные клетки содержат последовательность вирусной нуклеиновой кислоты, встроенную (интегрированную) в клеточный геном. Например, мышинные клетки 3Т3, трансформированные вирусом SV40, содержат от 1 до 15 копий вирусного генома на диплоидный набор ДНК. Присутствующая в трансформированной клетке вирусная нуклеиновая кислота экспрессируется. Так, все трансформированные клетки 3Т3 содержат все или некоторые РНК, появляющиеся на ранних стадиях продуктивной инфекции, и, как было отмечено выше, в ядрах обнаружен Т-антиген. Хотя предполагается, что между интеграцией вирусного генома и трансформацией пермиссивных клеток имеется причинно-следственная связь, это еще не подтверждено окончательно.

Изолировано большое количество температурочувствительных мутантов вируса SV40. Эти мутанты растут и размножаются при температуре 33°C (пермиссивная температура), но не могут расти при 41°C (непермиссивная температура). Эти температурочувствительные мутанты распадаются на четыре *комплементационные* группы. Так, если восприимчивую клетку коинфицировать двумя температурочувствительными мутантами, у которых мутации расположены в разных генах, мутанты *дополняют* друг друга. Четыре

гена SV40, обнаруженные с помощью такого комплементарного теста, кодируют Т-антиген, (А ген) и капсидные белки VP1, VP2 и VP3.

Уточненный анализ генома SV40 был проведен с использованием специфических рестрикционных эндонуклеаз (гл. 25). Расщепление SV40 ДНК этими ферментами дает дискретные, легко разделяемые фрагменты. Анализ с помощью рестрикционных нуклеаз дал детальную карту тонкой структуры хромосомы SV40, на которой каждому гену соответствует специфический фрагмент молекулы ДНК. Впоследствии, когда будет закончен анализ первичной структуры ДНК SV40, это будет увязано со специфической нуклеотидной последовательностью*. Карта расщепления ДНК SV40 рестрикционными эндонуклеазами приведена на рис. 28.7.

28.3. Вирусы с одонитевой ДНК

28.3.1. Бактериофаг ϕ X174

Маленький полиэдрический вирус, инфицирующий *E. coli* — ϕ X174, содержит одонитевую циркулярную молекулу ДНК, состоящую из 5370 нуклеотидов. Как свидетельствует комплементарный анализ, описанный выше для SV40, фаг ϕ X174 содержит девять генов (от А до Н), большая часть которых кодирует структурные белки вируса. ДНК маленького нитевидного вируса M13 (или fd) имеет такие же размер и структуру. Репликация ДНК ϕ X174 происходит путем синтеза цепи, комплементарной исходной ДНК, с помощью хозяйских ферментов (гл. 25) с образованием циркулярной замкнутой двухнитевой молекулы ДНК, называемой RFI (репликативная форма I). Полуконсервативная репликация родительской RFI, вероятно по механизму катящегося кольца (гл. 25), дает множество копий — двуспиральных молекул, которые затем служат матрицей для синтеза одиночных цепей опять по механизму катящегося кольца. Одонитевые ДНК покрываются оболочкой и образуют инфекционное вирусное потомство, которое высвобождается из клетки, когда эндолизин, кодируемый одним из вирусных генов (ген Е), вызывает лизис клетки.

Знание аминокислотной последовательности основных белков кодируемых фагом ϕ X174, и почти полной нуклеотидной последовательности позволило точно локализовать границы каждого гена на последовательности ДНК (рис. 28.8). Хотя длина ДНК ϕ X174 составляет 5370 нуклеотидов, для кодирования девяти белков, кодируемых вирусом, необходимо примерно 6100 нуклеотидов. Кажущееся несоответствие было разрешено, когда обнаружили, что

* Недавно такой анализ был завершен. — Прим. перев.

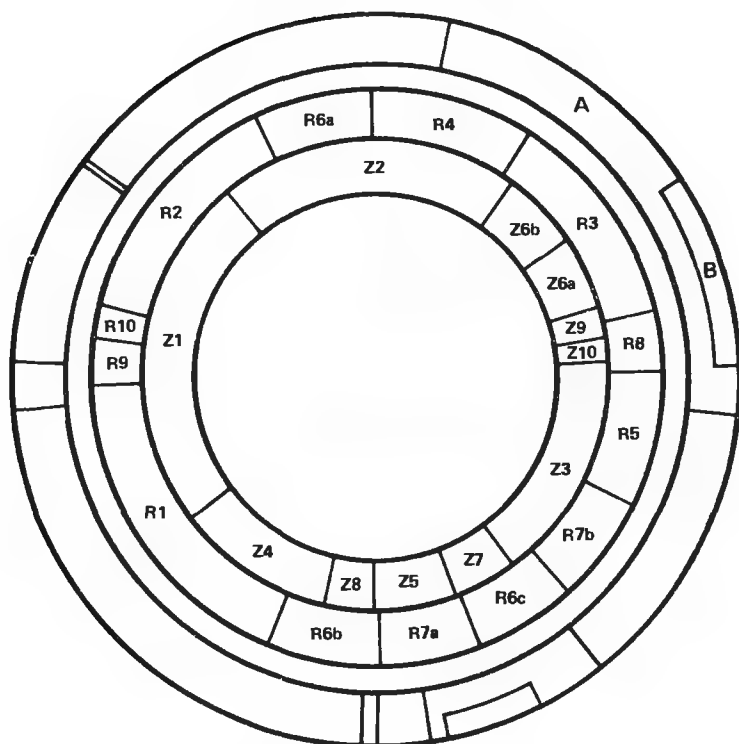


Рис. 28.8. Генетическая и рестрикционная карта ϕ X174. Границы генов D, E, J, F, G и H установлены комплементационным анализом и расположены с помощью рестрикционных карт фрагментов, полученных при действии эндонуклеазы *Hae*III (обозначены Z) и *Hind*II (обозначены R). (Barrell B. G., Air G. M., Hutchison C.A., Nature, 264, 34, 1976.)

ген D, определяющий белок с неизвестной функцией, лежит внутри последовательности гена E, который кодирует эндолизин, т. е. *два гена транслируются с одной нуклеотидной последовательности, но отличаются рамкой считывания* (гл. 26). Несмотря на то что два гена транслируются со сдвигом рамки считывания с одной и той же последовательности ДНК, эти гены независимы, о чем свидетельствуют стандартные генетические критерии. Например, терминирующая нонсенс-мутация в гене E не мешает образованию полностью функционального белка D гена нормальной длины, а у нонсенс-мутанта по гену D полностью сохранена функция гена E. Аналогичным образом ген B полностью кодируется последовательностью, находящейся внутри последовательности гена A, но со сдвигом рамки считывания. Возможно, что размер генома

фага ϕ X174 ограничен в связи с проблемой упаковки или какими-либо другими причинами. Поэтому использование одной и той же последовательности нуклеотидов для кодирования двух различных белков с помощью сдвига рамки может служить весьма экономичным методом для преодоления таких ограничений размера.

Определение полной первичной структуры ДНК фага ϕ X174 и идентификация расположения генов подтвердили точность локализации инициаторных и терминаторных кодонов, определенных ранее с помощью менее прямых генетических методов (гл. 26).

28.4. РНК-содержащие вирусы

28.4.1. Вирусы с (+)РНК-геномом

РНК-содержащие бактериофаги *E. coli* (Q β , R17, MS2) и *пикорнавирусы*, которые включают вирусы, ответственные за *полиомиелит*, *ящур крупного рогатого скота* и *миокардит* содержат однонитевую (+)РНК. Бактериофаговые РНК содержат примерно 3000 оснований, а пикорнавирусы — от 7000 до 8000 оснований. Во всех случаях вирионы являются сферическими частицами примерно 25 нм диаметром с икосаэдрической симметрией.

Благодаря относительной простоте размножение РНК-содержащих бактериофагов изучено наиболее детально. После проникновения фаговой РНК в клетку она работает как мРНК, направляя синтез капсидных белков (белков оболочки) и одной субъединицы фагоиндуцированной *РНК-репликазы* — фермента, ответственного за синтез фаговой РНК. Репликазная субъединица совместно с тремя хозяйскими белками (белок рибосомной 30S-субчастицы S1 и фактор роста цепи EF-T, состоящий из двух белков, см. гл. 26) дает функциональную РНК-репликазу, которая образует инициаторный комплекс при участии еще одного хозяйского белкового фактора. Детали этого процесса показаны на рис. 28.9.

Кроме РНК-репликазной субъединицы и белка оболочки бактериофаговая РНК кодирует третий белок, так называемый *белок созревания*, который необходим для правильной сборки вириона. В отличие от капсидного белка, которого имеется 180 копий на вирион, белок созревания представлен в вирионе только одной копией.

Контроль синтеза фаговых белков осуществляется на уровне трансляции (гл. 26). На каждой цепи (+)РНК имеются три участка связывания рибосом, и каждый из них служит начальной точкой трансляции одного из трех белков, закодированных фаговой РНК. Синтезируются различные количества этих белков и синтез каждого из трех кодируемых фаговой РНК белков регулируется независимо и обусловлен различной доступностью инициаторной

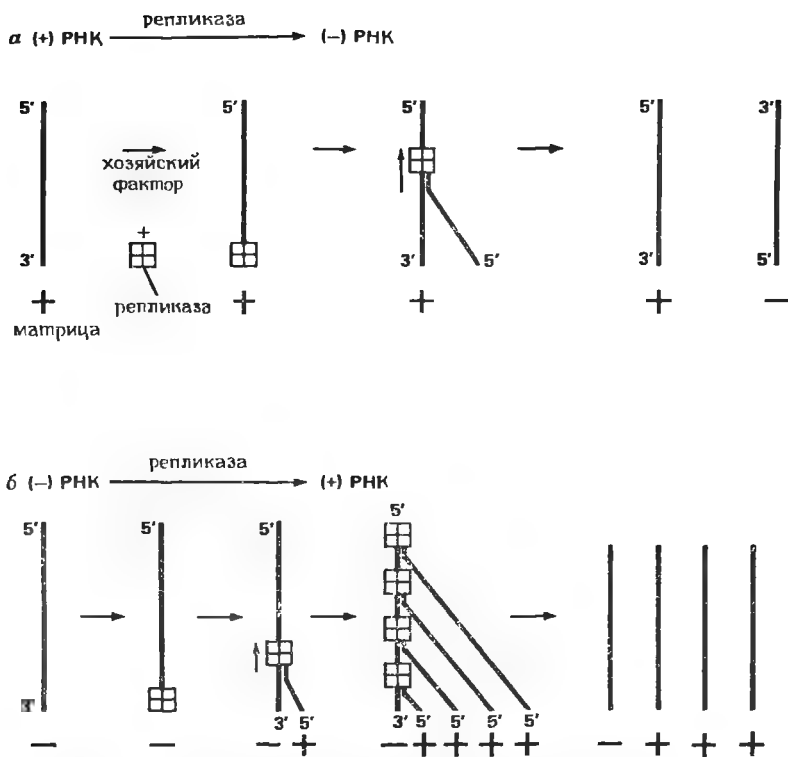


Рис. 28.9. Схема репликации РНК бактериофагов. Детали см. в тексте.

AUG-последовательности для рибосом. Кроме того, синтез капсидного белка дерепрессирует синтез РНК-репликазы, а избыток капсидного белка репрессирует синтез репликазы.

Способ инициации инфицирования полиовирусной РНК почти такой же, как и бактериофаговой РНК. (+)РНК функционирует как мРНК, используя аппарат трансляции клетки-хозяина для синтеза капсидных белков и полиоспецифической РНК-репликазы. Репликаза образует множество копий (-)РНК, которые затем служат матрицами для синтеза (+)цепей. Последние затем покрываются капсидными белками и образуют вирусное потомство.

В отличие от бактериофаговой РНК полиовирусная РНК кодирует шесть белков: РНК-репликазу, четыре белка оболочки и один белок (X) с неизвестной функцией. В отличие от фаговой РНК полиовирусная мРНК транслируется в виде одной длинной полипептидной цепи, состоящей из 2300 аминокислотных остатков. Этот полипептид затем последовательно расщепляется химотрипсиноподобными протеазами клеток-хозяев (и, возможно, вирусной про-

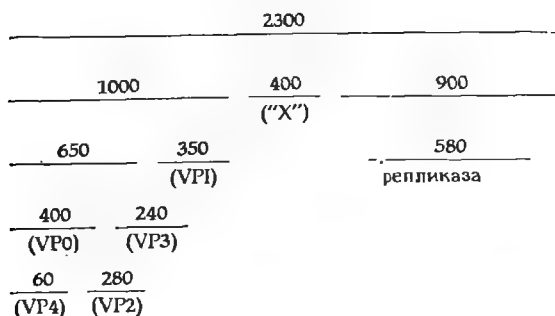


Рис. 28.10. Созревание путем протеолитического расщепления полипептида длиной 2300 остатков, синтезировавшегося при инфицировании полиовирусом.

теазой) на шесть белков, как показано на рис. 28.10. Предполагается, что расщепление VP0 происходит во время сборки вириона из РНК и прокапсида (VP0, VP1 и VP3).

Также в отличие от бактериофаговой РНК полиовирусная имеет только одно место связывания рибосом на (+)РНК. Вследствие этого все шесть белков, возникающих при протеолизе, образуются в эквимоллярных количествах. Наличие только одной инициаторной последовательности для трансляции у 5'-конца (или вблизи от него) каждой мРНК, вероятно, является одним из наиболее фундаментальных различий между прокариотическими и эукариотическими клетками. До сих пор не обнаружено ни одной эукариотической мРНК, с которой транслировалась бы более чем одна первичная полипептидная цепь.

28.4.2. Вирусы с (—)РНК-геномом

Два больших класса вирусов — *рабдовирусы*, например *вирус везикулярного стоматита (VSV)* и *бешенства*, а также *парамиксовирусы*, например *вирус болезни Ньюкасла* цыплят, *парагриппа*, *свинки*, *кори* и *вирус чумы собак*, содержат в вирионе (—)РНК. Эти вирусы сложнее, чем рассмотренные выше, так как они покрыты мембраной, состоящей из липидов и гликопротеидов.

Наиболее детально среди этих вирусов исследован вирус везикулярного стоматита. Вирус состоит из одной молекулы РНК длиной 11,5 тысяч оснований и пяти различных белков: N (M 50 000), 700 копий; L (M 190 000), 50 копий; NS (M 40 000), небольшое количество копий; G (M 70 000), 500 копий; M (M 29 000), 1600 копий. Белки G и M входят в состав вирусной оболочки.

При проникновении через мембрану инфицируемой клетки вирус освобождается от оболочки, и в цитоплазму попадает *нуклеокапсид*. Вирусная РНК-полимераза (белки L и, вероятно, NS)

транскрибирует вирусную (—)РНК и присоединяет полиаденилатную последовательность к 3'-концу синтезированной (+)РНК (гл. 26). Для синтеза каждого белка образуется отдельная молекула мРНК. Затем (+)мРНК связываются с хозяйскими рибосомами, и вирусные белки синтезируются с использованием хозяйской системы трансляции. Количество каждой синтезированной мРНК примерно соответствует количеству молекул каждого белка в вирионе. Так, количество молекул белка N в вирионе в десять раз больше, чем белка L; соответственно концентрация мРНК для белка N в десять раз больше, чем для белка L.

Репликация вирусной РНК начинается после того, как прошла инициация синтеза новых вирусных белков. Сначала синтезируется (+)РНК такой же длины, как и (—)РНК в составе вириона. (+)РНК далее служит матрицей для синтеза новых молекул вирусной РНК, которые покрываются белком N, образуя нуклеокапсид. Сборка инфекционной вирусной частицы заканчивается тогда, когда нуклеокапсид покрывается компонентами клеточной мембраны, которая снабжает белками G и M. Наконец, вирус высвобождается из инфицированной клетки почкованием из клеточной мембраны.

28.4.3. РНК-содержащие вирусы с однопитевым фрагментированным геномом

Одним из наиболее известных вирусов такого типа является *вирус гриппа*, который представляет собой сферические частицы диаметром 110 нм, покрытые мембраной, состоящей из липидов клетки-хозяина и вирусспецифичных белков. Внутри мембраны находятся семь молекул (—)РНК (M от 3,4 до $9,8 \cdot 10^5$), каждая из которых ассоциирована с РНК-полимеразой.

После инфицирования молекулы (—)РНК транскрибируются с образованием (+)РНК соответствующей длины, которые затем приобретают полиаденилатный хвост на 3'-конце и метилгуанилатный «кап» на 5'-конце (гл. 26). Молекулы (—)РНК остаются немодифицированными. Молекулы (+)мРНК транслируются рибосомами клеток-хозяев, давая вирусспецифические белки, а также служат матрицами для синтеза комплементарных фрагментов (—)РНК. Механизм этого непонятен; также неизвестно, каким образом отдельные семь молекул (—)РНК, составляющие полный геном вируса гриппа, собираются с образованием полного инфекционного вириона.

Гемагглютинин и нейраминидаза присутствуют в вирусной оболочке и являются основными вирусными антигенами. Оба являются гликопротеидами, и антитела против них защищают от инфицирования вирусом гриппа. Антигенная специфичность вируса гриппа сильно варьирует. Мутации РНК приводят к аминокислотным за-

менам в гемагглютанине и нейраминидазе, вызывая изменения их антигенной специфичности. Так как эти белки кодируются различными генами, их антигенная структура изменяется независимо. Считается, что большие пандемии гриппа, охватывающие мир с интервалом 10—12 лет, возникают вследствие больших изменений специфичности, соответствующих изменениям гемагглютинина и нейраминидазы или их обоих.

28.4.4. РНК-содержащие вирусы с двухнитевым фрагментированным геномом

Реовирус представляет собой семейство сферических вирусов, содержащих десять различных молекул двуспиральной РНК, общее количество оснований — 23 000. Десять молекул распадаются на три группы: три молекулы содержат по 2300 пар оснований, три — по 4500 и четыре — по 1200 пар оснований. Предполагается, что эти десять молекул находятся вместе и расположены специфическим образом.

Кроме РНК вирион реовируса содержит семь различных белков: два длиной по 1500 остатков, два — по 750 и три — по 400 остатков. Два белка, содержащих по 400 остатков, и один из содержащих 750 остатков обнаружены во внешней оболочке вириона; остальные белки расположены внутри вместе с РНК. Длина полипептидных цепей соответствует длине трех групп фрагментов РНК, так как каждая аминокислота кодируется тремя основаниями, а каждый фрагмент РНК транскрибируется в одну молекулу мРНК. Это тесное соответствие между длиной фрагмента генома и полипептидной цепи является еще одним примером общего правила для эукариотических мРНК, приведенного выше (разд. 28.4.1), согласно которому каждая мРНК кодирует только один белок.

Когда реовирус инфицирует свою клетку-хозяина, белки внешней оболочки удаляются, а сердцевина (core) проникает в цитоплазму. Удаление оболочки активирует РНК-полимеразу, присутствующую в сердцевине вириона. Затем полимеразы транскрибируют все десять фрагментов генома, но делает это асимметрически (только одну из двух нитей РНК) и консервативно. На каждой РНК имеется только один участок инициации и один участок терминирования, расположенные на концах фрагментов, так что синтезированная мРНК имеет точно такую же длину, что и фрагменты генома. мРНК выходят из сердцевины вириона, а фрагменты генома остаются внутри. Вирусные мРНК необычны — они не содержат полиаденилатной последовательности на 3'-конце, но, как и у (+)РНК генома, у них 5'-конец «кепирован».

Хотя во время инфекционного цикла транскрибируются все фрагменты генома, они транскрибируются с различной эффективностью. Различные мРНК также транслируются с различной эф-

фективностью. Благодаря этому вирусные белки могут синтезироваться примерно в таком соотношении, в каком они находятся в вирионе.

Суммируя вышесказанное, можно сказать, что вирион реовируса содержит десять фрагментов двухнитевой РНК; каждый фрагмент дает одну мРНК; каждая мРНК кодирует один белок. Репликация двухнитевых фрагментов РНК идет через те же самые (+)мРНК, на которых синтезируются вирусные белки. Таким образом, асимметричная консервативная транскрипция фрагментов вирионной РНК приводит к образованию однонитевых (+)мРНК; они реплицируются, давая новые двухнитевые фрагменты РНК, которые затем включаются в дочерние вирионы.

28.4.5. Онкогенные РНК-содержащие вирусы

Онкогенные РНК-содержащие вирусы инфицируют множество видов животных (приматы, низшие млекопитающие, птицы и т. д.) и в зависимости от инфицирующего вириона могут индуцировать лейкемии, лимфомы или саркомы. Сферическая сердцевина вириона окружена мембранной оболочкой, состоящей из гликопротеида и липида. Вирион содержит от 7 до 10 различных белков с $M 11 \div 100 \cdot 10^3$, включая РНК-зависимую ДНК-полимеразу (обратная транскриптаза, см. гл. 25), и три или четыре, вероятно, идентичные молекулы РНК с $M 3 \cdot 10^6$ (10 000 пар оснований). В случае вируса саркомы Роуса каждый вирион содержит молекулу тРНК^{Tr}, которая служит затравкой для синтеза цепи ДНК в гибриде РНК-ДНК, являющемся продуктом действия обратной транскриптазы (гл. 25). В отличие от папававирусов, например SV40, РНК онкогенных вирусов обычно не убивает клетку, в которой она реплицируется, и репликация и трансформация являются часто сопутствующими событиями. Пути синтеза мРНК и репликации вирусного генома, показанные на рис. 28.11, состоят из следующих стадий: 1) инфицирующий вирион связывается со специфическими клеточными рецепторами, проникает в клетку и теряет оболочку; 2) с использованием обратной транскриптазы вириона синтезируется цепь ДНК, комплементарная инфицирующей вирусной РНК; 3) синтезируется цепь ДНК, последовательность которой идентична последовательности вирусной РНК; 4) дуплекс ДНК, образовавшийся на последних двух стадиях, превращается в циркулярный и интегрируется в геном клетки-хозяина (механизм интеграции неизвестен); 5) происходит транскрипция интегрированного провируса; 6) на последней стадии инфекционного цикла транскрипты провируса переходят в цитоплазму, где они служат в качестве мРНК для синтеза вирусных белков. Созревающий вирион мигрирует к клеточной поверхности, с которой он отпочковывается, приобретая при этом внешнюю оболочку. Предполагается, что инфицированная

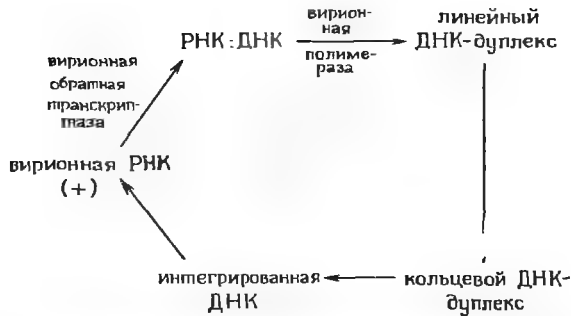


Рис. 28.11. Пути синтеза мРНК и репликации вируса саркомы Роуса.

клетка после деления и начала транскрипции приобретает трансформированный фенотип.

28.5. Интерферон

Название «интерферон» получил класс небольших гликопротеидов с M от 26 000 (мышинный и человеческий интерфероны) до 38 000 (интерферон цыплят), которые ингибируют размножение многих вирусов животных. Так как интерферон образуется в вирусинфицированных клетках быстрее, чем специфические антитела, это дает возможность ограничивать вирусную инфекцию. Образование и выделение интерферона индуцируются двуспиральными РНК, промежуточными продуктами репликации РНК-содержащих вирусов. Как сказано выше, интерферон обладает клеточной специфичностью — различные вирусы, инфицируя одни и те же клетки, вызывают образование одного и того же интерферона.

Механизм, с помощью которого интерферон ингибирует размножение вирусов, неизвестен; однако обнаружено, что он ингибирует синтез всех белков, как хозяйских, так и вирусных, скорее на уровне трансляции, чем транскрипции. В присутствии интерферона инфицированная клетка погибает, однако при этом вирусное потомство либо вообще не образуется, либо образуется в очень малом количестве, и благодаря этому инфекция купируется. Современные гипотезы для объяснения действия интерферона сводятся к тому, что вирусная инфекция приводит к образованию двуспиральной РНК, что каким-то образом индуцирует образование интерферона. Клетки, обработанные интерфероном, переходят в *анти-вирусное состояние*, при котором образованный интерфероном ингибитор связывается с рибосомами и блокирует трансляцию.

ЛИТЕРАТУРА

Книги

- Cohen S. S., *Virus-induced Enzymes*, Columbia University Press, New York, 1968.
- Davis B. D., Dulbecco R., Eisen H. N., Ginsberg H. S., Wood W. B., *Microbiology*, 2d ed., sec. V, Harper and Row, Publishers, New York, 1973.
- Fenner F., McAuslan B. R., Mims C. A., Sambrook J., White D. O., *The Biology of Animal Viruses*, vols. I and II, Academic Press, Inc., New York, 1974.
- Fox C. F., Robinson W. S., eds., *Virus Research*, Academic Press, Inc. New York, 1973.
- Fraenkel-Conrat H., Wagner R. R., eds., *Comprehensive Virology*, vols. 1—5, Plenum Press, New York, 1974.
- Gross L., *Oncogenic Viruses*, Pergamon Press, Oxford, 1970.
- Hershey A. D., ed., *The Bacteriophage Lambda*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N. Y., 1971.
- Kornberg A., *DNA Synthesis*, W. H. Freeman Company, San Francisco, 1974.
- Lauffer M. A., Bang F. B., Maramorosch K., Smith K. M., eds., *Advances in Virus Research*, vols. 1—20, Academic Press, Inc., New York, 1953.
- Luria S. E., Darnell J. E., Jr., *General Virology*, 3d ed., John Wiley and Sons, Inc., New York, 1977.
- Mathews C. K., *Bacteriophage Biochemistry*, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1971.
- Toozee J., *The Molecular Biology of Tumour Viruses*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N. Y., 1973.
- Toozee J., Sambrook J., eds., *Selected Papers in Tumour Virology*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N. Y., 1974.
- Tumor Viruses*, Cold Spring Harbor Symp. Quan. Biol., vol. 34, 1974.
- Zinder N., ed. *RNA Phages*, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, N. Y., 1975.

Обзорные статьи

- Baltimore D., *Expression of Animal Virus Genomes*, *Bacteriol. Rev.*, 35, 235—241, 1971.
- Casjens S., King J., *Virus Assembly*, *Annu. Rev. Biochem.*, 44, 555—611, 1975.
- Dulbecco R., *Mechanisms of Virus-induced Oncogenesis*, pp. 1057—1065, in: F. O. Schmitt and F. G. Worden, eds., *The Neurosciences, Third Study Program*, MIT Press, Cambridge, Mass., 1974.
- Eckart W., *Oncogenic Viruses*, *Annu. Rev. Biochem.*, 41, 503—516, 1972.
- Huang A. S., *Defective Interfering Viruses*, *Annu. Rev. Microbiol.*, 27, 101—118, 1973.
- Kleinschmidt W. J., *Biochemistry of Interferin*, *Annu. Rev. Biochem.*, 41, 517—542, 1972.
- Sanger F., Air G. M., Barrell B. G., Brown N. L., Coulson A. R., Fiddes U. G., Hutchinson C. A., III, Slocombe P. M., Smith M., *Nucleotide Sequence of Bacteriophage ϕ X174*, *Nature*, 265, 687, 1977.
- Silverstein S. C., Christman J. K., Acs G., *The Reovirus Replicative Cycle*, *Annu. Rev. Biochem.*, 45, 375—408, 1976.
- Temin H. M., *Mechanism of Cell Transformation by RNA Tumor Viruses*, *Annu. Rev. Microbiol.*, 25, 609—648, 1971.
- Wood W. B., Revel H. R., *The Genome of Bacteriophage T4*, *Bacteriol. Rev.*, 40, 847—868, 1976.

СОДЕРЖАНИЕ

Глава 14. Метаболизм углеводов. I	541
14.1. Переваривание углеводов пищи	542
14.1.1. Переваривание полисахаридов при участии слюны	542
14.1.2. Панкреатическая амилаза	542
14.1.3. Перевариваемые и неперевариваемые полисахариды	543
14.1.4. Переваривание олигосахаридов	543
14.2. Всасывание углеводов в кишечнике	545
14.2.1. Поступление глюкозы в клетки	547
14.3. Метаболизм углеводов. Некоторые общие положения	549
14.3.1. Глюкозо-6-фосфат	554
14.4. Гликолиз	557
14.4.1. Фруктозо-6-фосфат	562
14.4.2. Фруктозо-1,6-дифосфат	562
14.4.3. Гликолиз и окисление пирувата; выход АТФ	577
14.5. Анаплероз	582
14.5.1. Метаболизм промежуточных продуктов в цикле лимонной кислоты	584
14.6. Глюконеогенез	587
14.6.1. Путь образования глюкозы из молочной кислоты	587
14.7. Регуляция гликолиза и глюконеогенеза	592
14.7.1. Регуляция гликолиза и глюконеогенеза в условиях голодания	598
14.8. Фосфоглюконатный окислительный путь	599
14.8.1. Метилглюксальевый окольный путь	608
14.9. Некоторые альтернативные пути метаболизма углеводов в растениях и микроорганизмах	609
14.9.1. Путь глиоксальной кислоты	609
14.9.2. Метаболизм ацетилфосфата у микроорганизмов	610
14.9.3. Биосинтез пропионовой кислоты у микроорганизмов	610
14.9.4. Пути превращений ацетальдегида	611
Глава 15. Метаболизм углеводов. II	612
15.1. Полисахариды как резервы энергии	612
15.2. Метаболизм гликогена	615
15.3. Метаболизм гликогена в скелетной мышце	617
15.3.1. Гликогенолиз	617
15.3.2. Фосфоролиз гликогена	618
15.3.3. Фосфоглюкомутаза	620
15.3.4. Гликоген-фосфорилаза	621
15.3.5. Киназа фосфорилазы	623
15.3.6. Фосфатазы в гликогенолизе	625
15.3.7. Процесс расщепления связей в местах ветвления; продукция глюкозы	626
15.3.8. Синтез гликогена в скелетной мышце	626
15.4. Метаболизм гликогена в печени	633
15.5. Физиологическая роль гликогена	636
15.5.1. Гликоген тканей	637
15.5.2. Гликоген печени	637
15.5.3. Гликоген мышцы	638
15.5.4. Наследственные расстройства и метаболизм гликогена	639
15.6. Глюкоза крови и регуляция метаболизма гликогена	641
15.6.1. Источники и превращения глюкозы крови	642
15.6.2. Факторы, влияющие на концентрацию глюкозы в крови	643
15.6.3. Толерантность к глюкозе	646
15.7. Взаимопревращение гексоз	648
15.7.1. Альдозо-кетозные превращения; изомеразы	648
15.7.2. Мутазы	650
15.7.3. Пирофосфорилазы	650

15.7.4.	Эпимеразы	651
15.7.5.	Аспекты метаболизма галактозы	652
15.7.6.	Метаболизм фруктозы	653
15.7.7.	Окисление; образование уроновых кислот	654
15.7.8.	Многоатомные спирты	655
15.7.9.	Оксидоредуктазы; образование дезоксигексоз	656
15.7.10.	Декарбоксилирование	657
15.7.11.	Образование аминосахаров	658
15.7.12.	Образование сиаловых кислот	658
15.7.13.	Механизм контроля взаимопревращений гексоз	659
15.8.	Биосинтез гликозидов	660
15.8.1.	Гликозилтрансферазы	660
15.8.2.	Биологическая роль олигосахаридов	663
15.8.3.	Синтез гетероолигосахаридов в гликопротеидах и глико- липидах	664
15.9.	Клеточные стенки растений	670
15.10.	Структура полимеров бактериальных клеточных стенок	670
15.10.1.	Пептидогликан	670
15.10.2.	Тейхоевые кислоты	673
15.10.3.	Липополисахариды	673
15.10.4.	Капсулярные полисахариды	674
15.11.	Биосинтез полимеров бактериальной клеточной стенки	674
15.11.1.	Синтез пептидогликана	675
Глава 16.	Метаболизм углеводов. III	683
16.1.	Фиксация CO_2	685
16.1.1.	Темновая реакция	685
16.2.	Синтез углеводов	687
16.2.1.	Синтез гомополисахаридов	695
16.3.	Фотосинтетический процесс	699
16.3.1.	Молекулярная абсорбция света	699
16.3.2.	Тилакоидная мембрана	701
16.3.3.	Фотохимический акт	707
16.3.4.	Бактериальный фотосинтез	710
16.4.	Фотохимический процесс у водорослей и высших растений	714
16.4.1.	Транспорт электронов при фотосинтезе	715
16.4.2.	Фотосинтетическое фосфорилирование	721
16.4.3.	Регуляция фотосинтеза	724
	Литература	727
Глава 17.	Метаболизм липидов. I	730
17.1.	Переваривание липидов пищи	730
17.1.1.	Переваривание липидов в желудке	730
17.1.2.	Переваривание липидов в кишечнике	731
17.2.	Всасывание липидов в кишечнике	733
17.2.1.	Факторы, влияющие на всасывание липидов	734
17.2.2.	Липиды кала; стеаторрея	735
17.3.	Липиды крови и липопротеиды	736
17.3.1.	Основные представления о метаболизме триацилглице- ринов	739
17.4.	Липиды тела	740
17.4.1.	Функции липидов тела	740
17.4.2.	Характеристика депонированных липидов	741
17.4.3.	Аспекты метаболизма липидов организма	742
17.5.	Окисление жирных кислот	742
17.5.1.	Реакции активации	744
17.5.2.	Роль карнитина в транспорте ацильных остатков жирных кислот	744
17.5.3.	Ацил-СоА-дегидрогеназы	745
17.5.4.	Еноил-СоА-гидратазы (кротоназы)	745

17.5.5.	β-Оксиацил-СоА-дегидрогеназа	746
17.5.6.	Тиолазы	746
17.5.7.	α-Окисление жирных кислот	748
17.5.8.	ω-Окисление жирных кислот	750
17.5.9.	Метаболизм пропионата	750
17.6.	Синтез жирных кислот	752
17.6.1.	Цитоплазматический механизм синтеза пальмитиновой кислоты	753
17.6.2.	Удлинение молекул жирных кислот в митохондриях	759
17.6.3.	Удлинение молекул жирных кислот в микросомах	760
17.7.	Источники восстановленных нуклеотидов	760
17.7.1.	Синтез жирных окисиклот	762
17.7.2.	Другие аспекты синтеза жирных кислот	762
17.8.	Взаимопревращения жирных кислот	763
17.8.1.	Укорочение и удлинение углеродного скелета	763
17.8.2.	Образование мононенасыщенных кислот	763
17.8.3.	Образование и превращения полиненасыщенных кислот	764
17.9.	Синтез триацилглицеринов	767
17.10.	Регуляция метаболизма липидов	769
17.10.1.	Регуляция синтеза и депонирования липидов	769
17.10.2.	Мобилизация депонированных липидов и липидов печени	772
17.10.3.	Кетопровые тела и кетоз	776
17.10.4.	Взаимоотношения процессов метаболизма липидов	778
17.11.	Метаболизм этанола и алкоголизм; связь с метаболизмом липидов	780
Глава 18.	Метаболизм липидов. II	783
18.1.	Фосфолипиды	783
18.1.1.	Распределение и обмен	783
18.1.2.	Образование	783
18.1.3.	Действие фосфолипаз	791
18.2.	Сфинголипиды	792
18.2.1.	Образование сфингозинов	792
18.2.2.	Образование церамидов	793
18.2.3.	Образование сфингомиелинов	793
18.2.4.	Образование гликоcsфинголипидов	794
18.2.5.	Синтез цереброзидов	794
18.2.6.	Синтез ганглиозидов	794
18.2.7.	Сфинголипазы и нарушения метаболизма гликоcsфинголипидов (сфинголипидистрофии)	796
18.3.	Метаболизм стерина и его контроль	798
18.3.1.	Источники холестерина организма	798
18.3.2.	Регуляция метаболизма холестерина	808
18.4.	Другие нарушения метаболизма липидов	811
18.4.1.	Тучность	812
18.4.2.	Кахексия	812
18.4.3.	Абеталипопротеинемия	813
18.4.4.	Болезнь Танжера или наследственная недостаточность липопротеидов высокой плотности	813
	Литература	813
Глава 19.	Метаболизм липидов. III	816
19.1.	Химические свойства	816
19.2.	Биосинтез	820
19.3.	Метаболизм	824
19.4.	Биологическое действие	825
19.4.1.	Простагландины и циклический АМР (сАМР)	826
19.4.2.	Метаболизм простагландинов	826
19.4.3.	Действие на сердечно-сосудистую систему	828
19.4.4.	Действие на водно-электролитный обмен	829

19.4.5.	Действие на нервную систему	829
19.4.6.	Действие на желудочно-кишечный тракт	829
19.4.7.	Влияние на репродуктивную систему	829
19.4.8.	Воздействия на бронхи, трахею и гладкие мышцы	830
19.4.9.	Воспалительное действие	830
19.4.10.	Иммунное действие	831
19.4.11.	Воздействие на кожу	831
19.4.12.	Влияние на глаза	831
19.4.13.	Механизм действия простагландинов	831
19.5.	Краткие итоги	832
	Литература	832
Глава 20.	Метаболизм аминокислот. I. Растения и микроорганизмы	833
20.1.	Фиксация азота	833
20.1.1.	Восстановление азота	834
20.1.2.	Восстановление нитрата	835
20.2.	Фиксация аммиака	837
20.2.1.	Глутаматдегидрогеназа, реакция (1)	837
20.2.2.	Глутаматсинтаза, реакция (3)	838
20.2.3.	Глутаминсинтаза, реакция (2)	839
20.2.4.	Синтез карбамоилфосфата	841
20.3.	Синтез аминокислот	842
20.3.1.	Общие соображения	842
20.3.2.	Переаминирование	845
20.4.	Фиксация серы	850
20.4.1.	Синтез цистеина	850
20.5.	Заключительные замечания	868
Глава 21.	Метаболизм аминокислот. II. Млекопитающие	870
21.1.	Переваривание белков	872
21.1.1.	Желудочное пищеварение	872
21.1.2.	Протеолиз в кишечнике	873
21.2.	Всасывание аминокислот из кишечника	875
21.2.1.	Переход аминокислот из системы циркуляции в ткани	879
21.3.	Незаменимые для человека аминокислоты	879
21.4.	Метаболизм аминокислот в печени	881
21.4.1.	Переаминирование	881
21.4.2.	Образование в ходе метаболизма заменимых аминокислот	884
21.4.3.	Метаболизм аммиака	895
21.4.4.	Синтез мочевины	900
21.5.	Общие аспекты метаболизма аминокислот	902
21.5.1.	Использование аминокислот для синтеза белка	904
21.5.2.	Регуляция метаболизма аминокислот	906
Глава 22.	Метаболизм аминокислот. III	908
22.1.	Синтез амидов и олигопептидов	908
22.1.1.	Амиды	908
22.1.2.	Олигопептиды	908
22.1.3.	N-ациламинокислоты	911
22.1.4.	Меркаптуровые кислоты	913
22.2.	Переамидинирование	914
22.3.	Переметилирование	915
22.3.1.	Образование карнитина	916
22.3.2.	Судьба метильных групп	917
22.4.	Синтез порфиринов	918
22.4.1.	Синтез протопорфирина	918
22.5.	Декарбоксилирование аминокислот	924
22.5.1.	γ -Аминomásляная кислота	924
22.5.2.	β -Аланин	925
22.5.3.	Декарбоксилирование ароматических аминокислот	925

22.6.	Биосинтез полиаминов	930
22.6.1.	Путресцин и кадаверин	930
22.6.2.	Спермидин и спермин	931
22.6.3.	Метаболизм полиаминов	932
Глава 23.	Метаболизм аминокислот. IV	934
23.1.	Гликогенные и кетогенные аминокислоты	934
23.2.	Метаболическая судьба индивидуальных аминокислот	935
23.2.1.	Аланин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты	935
23.2.2.	Орнитин, пролин и оксипролин	936
23.2.3.	Глутамин	937
23.2.4.	Аспарагин	937
23.2.5.	Серин	938
23.2.6.	Глицин	938
23.2.7.	Цистеин	939
23.2.8.	Метионин	945
23.2.9.	Треонин	947
23.2.10.	Превращения валлина, лейцина и изолейцина	948
23.2.11.	Фенилаланин и тирозин	950
23.2.12.	Лизин	955
23.2.13.	Аргинин	958
23.2.14.	Гистидин	958
23.2.15.	Триптофан	961
	Литература	965
Глава 24.	Метаболизм пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов	968
24.1.	Синтез пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов	968
24.1.1.	Пути синтеза <i>de novo</i> пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов	968
24.1.2.	Взаимные превращения пуриновых нуклеотидов	974
24.1.3.	Запасные пути синтеза пуриновых нуклеотидов	976
24.1.4.	Регуляция синтеза пуриновых нуклеотидов	977
24.1.5.	Пути синтеза <i>de novo</i> пиримидиновых нуклеотидов	978
24.1.6.	Запасные пути синтеза пиримидиновых нуклеотидов	982
24.1.7.	Образование дезоксирибонуклеотидов	983
24.1.8.	Регуляция синтеза нуклеотидов	987
24.1.9.	Образование нуклеотидных коферментов	987
24.2.	Распад пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов	991
24.2.1.	Расщепление нуклеиновых кислот	991
	Литература	999
Глава 25.	Генетические аспекты метаболизма	1000
25.1.	Гены и метаболизм	1000
25.2.	Материальный носитель генов — ДНК	1002
25.2.1.	Некоторые генетические методы	1003
25.3.	Полуконсервативная репликация ДНК	1005
25.3.1.	Топология репликации ДНК	1006
25.3.2.	Ферменты репликации ДНК	1010
25.3.3.	Репарация повреждений ДНК	1019
25.3.4.	Модификация и рестрикция ДНК	1021
25.3.5.	Структура хромосом эукариот	1024
25.3.6.	Повторяющиеся последовательности в ДНК эукариот	1026
25.3.7.	Значение умеренноповторяющихся последовательностей	1030
25.4.	Манипуляции генетическими элементами	1031
25.4.1.	Выделение генов клонированием рекомбинантных молекул ДНК, сконструированных <i>in vitro</i>	1031
25.4.2.	Синтез генов <i>in vitro</i>	1033
25.5.	Нуклеотидный код и структура белков	1033
25.5.1.	Специфическая конформация белков	1034
25.5.2.	Простетические группы и модификация аминокислот	1036
25.5.3.	Проблемы кодирования	1039

Глава 26. Генетические аспекты метаболизма. II	1040
26.1. Ген и белковый синтез	1040
26.2. Компоненты механизма трансляции	1041
26.2.1. Транспортная РНК (тРНК)	1041
26.2.2. Активация аминокислот и их присоединение к тРНК	1043
26.2.3. Рибосомы	1045
26.2.4. Информация РНК	1046
26.3. Механизм трансляции	1047
26.3.1. Инициация синтеза полипептидов	1047
26.3.2. Элонгация полипептидной цепи	1051
26.3.3. Терминация полипептидной цепи	1052
26.3.4. Ингибиторы синтеза белков	1052
26.4. Генетический код	1054
26.4.1. Универсальность кода	1059
26.4.2. Мутации	1061
26.4.3. Супрессорные гены	1063
26.5. Транскрипция	1064
26.5.1. Структура бактериальных РНК-полимераз	1065
26.5.2. Стадии в синтезе РНК, направляемом ДНК	1066
26.5.3. РНК-полимеразы эукариот	1069
26.5.4. Созревание РНК-транскриптов	1070
26.5.5. Коллинеарность генетической карты и аминокислотной последовательности	1074
26.5.6. Молекулярная генетика гемоглобина	1076
26.6. Контроль синтеза белков	1080
26.6.1. Лактозный оперон	1082
26.6.2. Триптофановый оперон	1083
26.6.3. Синтез гена тирозиновой супрессорной тРНК	1086
26.6.4. Контроль белкового синтеза у эукариот	1089
26.7. Клеточный цикл	1091
Литература	1092
Глава 27. Генетические аспекты метаболизма. III	1095
27.1. Замещение аминокислот и функции белка	1096
27.2. Эволюция и структура белка	1099
27.2.1. Изменения генома	1103
27.3. Выражение эволюционных факторов	1114
27.4. Популяционные изменения и жизнеспособность	1116
27.5. Наследственные нарушения метаболизма	1116
27.5.1. Хромосомные аномалии	1122
Литература	1124
Глава 28. Вирусы	1125
28.1. Цикл размножения вирусов	1125
28.2. Вирусы с двухнитевой ДНК	1128
28.2.1. Бактериофаг Т4	1128
28.2.2. Обезьяний вирус 40	1132
28.3. Вирусы с однонитевой ДНК	1137
28.3.1. Бактериофаг ϕ X174	1137
28.4. РНК-содержащие вирусы	1139
28.4.1. Вирусы с (+) РНК-геномом	1139
28.4.2. Вирусы с (—) РНК-геномом	1141
28.4.3. РНК-содержащие вирусы с однонитевым фрагментированным геномом	1142
28.4.4. РНК-содержащие вирусы с двухнитевым фрагментированным геномом	1143
28.4.5. Онкогенные РНК-содержащие вирусы	1144
28.5. Интерферон	1145
Литература	1146

НЕКОТОРЫЕ СОКРАЩЕННЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ И ЕДИНИЦ

Следующие сокращенные обозначения,
встречающиеся в современной биохимической литературе,
использованы в данной книге.

Перечень не является полным; в большинстве случаев, когда в тексте впервые вводится
сокращенное обозначение, оно приводится в скобках.

АПБ	ацилпереносающий белок	СМР	цитидинмонофосфат (цитидин-5'-фосфат)
АХ	ацетилхолин	CoASH или CoA	кофермент А
АХЭ	ацетилхолинэстераза	СТР	цитидинтрифосфат
Ацетил-СоА	ацетилкофермент А	Cys	цистеин (цистенил)
Ацил-S-СоА	ацилкофермент А	dAMP	дезоксиаденозинмонофосфат
ДК	дыхательный коэффициент	dCMP	дезоксидитидинмонофосфат
ДНаза	дезоксирибонуклеаза	dGMP	дезоксигуанозинмонофосфат
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота	dIMP	дезоксиниозинмонофосфат
ДНФ	2,4-динитрофенол	Dol	долихол
ДОФА	3,4-диоксифенилаланин	dTMP	тимидинмонофосфат
ДИФФ	динизопропилфторфосфат	dTTP	тимидинтрифосфат
ГАМК	γ-аминомасляная кислота	EDTA	этилендиаминтетрауксусная кислота
3-Р-Глицериновая кислота	3-фосфоглицериновая кислота	Е	фермент
Креатин-Р	креатинфосфат	FAD(FADH ₂)	флавинадениндинуклеотид (восстановленная форма)
ПАБК	п-аминобензойная кислота		
РНаза	рибонуклеаза		
РНК	рибонуклеиновая кислота		
иРНК (или мРНК)	информационная (или матричная) РНК	FDP	фруктозо-1,6-дифосфат
рРНК	рибосомная РНК	FMN(FMNH ₂)	флавиномононуклеотид, восстановленная форма (рибофлавинфосфат)
тРНК	транспортная РНК	F-1-P	фруктозо-1-фосфат
СЖК	свободная жирная кислота	F-6-P	фруктозо-6-фосфат
циклический АМР (или сАМР)	аденозин-3',5'-цикломонофосфат (3',5'-циклогуаниловая кислота)	Fru	остаток фруктозы
циклический GMP (или сGMP)	гуанозин-3',5'-цикломонофосфат (3',5'-циклоадениловая кислота)	FSH	фолликулостимулирующий гормон
		Fuc	остаток фукозы
А (или Ade)	аденин	G (или Gua)	гуанин
А (или Ado)	аденозин	G (или Guo)	гуанозин
Abe	остаток абеквозы	Gal	остаток галактозы
АСТН	адренокортикотропный гормон	GalNAc	N-ацетилгалактозамин
ADP	аденозиндифосфат	GDP	гуанозиндифосфат
Ala	аланин (аланил)	GH	гормон роста (соматотропин)
AMP	аденозинмонофосфат (аденозин-5'-фосфат)	Glc	остаток глюкозы
Arg	аргинин (аргинил)	GlcA	глюконовая кислота
Asp	аспарагин (аспарагинил)	GlcN	глюкозамин
Asp	аспарагиновая кислота (аспартил)	GlcNAc	N-ацетилглюкозамин
АТР	аденозинтрифосфат	GlcUA	глюкуроновая кислота
АТРаза	аденозинтрифосфатаза	Gln	глутамин (глутаминил)
С (или Cyt)	цитозин	Glu	глутаминовая кислота (глутамил)
С (или Cyt)	цитидин	Gly	глицин (глицил)
CDP	цитидиндифосфат	GMP	гуанозинмонофосфат (гуанозин-5'-фосфат)
Cer	церамид		

НЕКОТОРЫЕ СОКРАЩЕННЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ И ЕДИНИЦ (продолжение)

G-1-P	глюкозо-1-фосфат	NMN	никотинамидмононуклеотид
G-6-P	глюкозо-6-фосфат	P _i	неорганический фосфат
GSH	глутатион (восстановленный)	PEP	фосфоенолпироват
GSSG	глутатион (окисленный)	pGlu	пироглутамил
GTP	гуанозинтрифосфат	Phe	фенилаланин (фенилаланил)
Hb	гемоглобин	pI	изоэлектрическая точка
HbCO	СО-гемоглобин	PP _i	неорганический пирофосфат
HbO ₂	оксигемоглобин	Pro	пролин (пролил)
His	гистидин (гистидил)	PRPP	5-фосфорибозил-1-пирофосфат
HMC	5-оксиметилцитозин	Rha	остаток рамнозы
Hyl	оксипролин	S	константа Сведберга
Hyp	оксипролин (оксипролил)	Ser	серин (серил)
I	инозин (гипоксантинрибонуклеозид)	T (или Thy)	тимин
ICSH (или LH)	гормон, стимулирующий интерстициальные клетки	T (или Thd)	тимидин
IdUA	идуроновая кислота	ThPP	тиаминпирофосфат
Ile	изолейцин (изолейлил)	Thr	треонин (треонил)
IMP	инозинмонофосфат	Trp	триптофан (триптофанил)
K _i	константа ингибирования	TSH	тиреотропин (тиреоидстимулирующий гормон)
K _m	константа Михаэлиса	Tyr	тирозин
Leu	лейцин (лейлил)	U (или Ura)	урацил
LH (или ICSH)	лютеинизирующий гормон	U (или Urd)	уридин
Lys	лизин (лизил)	UDP	уридиндифосфат
M	молекулярная масса	UDPглюкоза	уридиндифосфатглюкоза
Man	остаток маннозы	UMP	уридинмонофосфат (уридин-5'-фосфат)
Met	метионин (метионил)	Und	ундекапренол
MetHb	метгемоглобин	UTP	уридинтрифосфат
MSH	меланоцитстимулирующий гормон	V _{max}	максимальная скорость
NAD ⁺ (NADH)	никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма)	Val	валин (валил)
NADP ⁺ (NADPH)	никотинамидадениндинуклеотид-фосфат (восстановленная форма)	XMP	ксантиозинмонофосфат
NeuAc	N-ацетилнейраминаовая кислота	Xyl	остаток ксилозы
NeuGlyc	N-гликозилнейраминаовая кислота		

Некоторые другие обозначения приведены по мере необходимости в таблицах, например, обозначения нуклеозидов, найденных в транспортных РНК из различных источников, приведены в табл. 7.6, сокращения аминокислотных остатков — в табл. 4.1.